

Aus der Bundesforschungsanstalt
für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen
Präsident: Prof. Dr. M. Mussgay

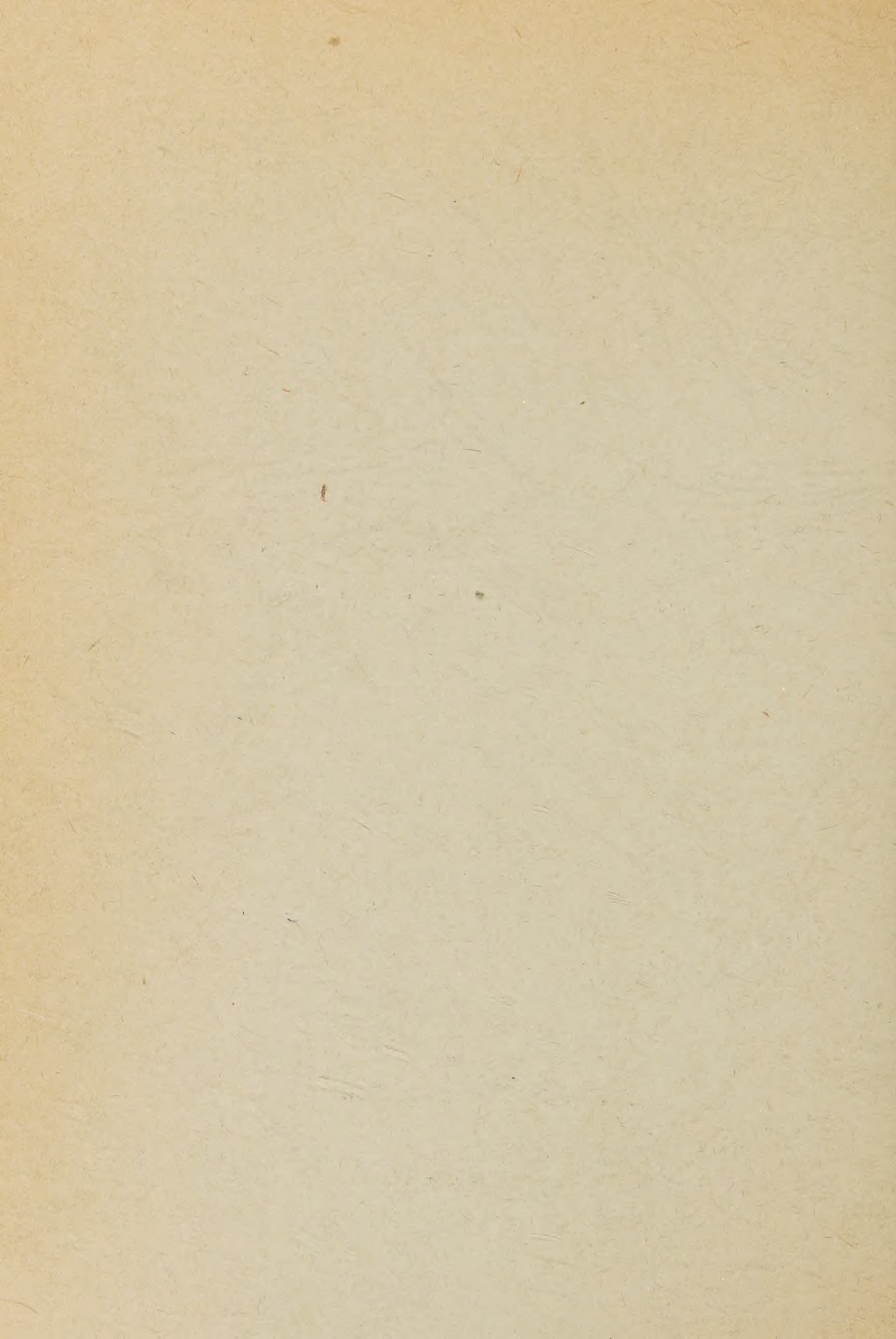
Eingereicht über das Institut für Virologie
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Prof. Dr. R. Rott

Charakterisierung und Typisierung eines aus Schafen isolierten Adenovirus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Hermann Müller
Tierarzt aus Berlichingen

Gießen 1974





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Bundesforschungsanstalt
für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen
Präsident: Prof. Dr. M. Mussgay

Eingereicht über das Institut für Virologie
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Prof. Dr. R. Rott

Charakterisierung und Typisierung eines aus Schafen isolierten Adenovirus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Hermann Müller
Tierarzt aus Berlichingen

Gießen 1974

MEINEN ELTERN
IN DANKBARKEIT
GEWIDMET



Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin in Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Frimmer

Berichterstatter: Prof. Dr. R. Rott

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juli 1974

Abkürzungen

āā	zu gleichen Teilen
CPE	cytopathischer Effekt
CsCl	Cäsiumchlorid
DEAE	Diäthylaminoäthyl
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
et al.	und Mitarbeiter
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
FdUrd	5-Fluordesoxyuridin
g	relative Zentrifugalkraft
i.c.	intracerebral
IE	infektiöse Einheiten
i.E.	internationale Einheiten
i.m.	intramuskulär
JdUrd	5-Jod-2'desoxyuridin
KBR	Komplementbindungs-Reaktion
KID ₅₀	50% kulturinfektiöse Dosen
M	molar
MG	Molekulargewicht
N	normal
p.a.	zur Analyse
PEG	Polyäthylenglykol
p.i.	nach der Infektion
P _i	performance index
proz.	prozentig
PPO	2,5 Diphenyloxazol
RbCl	Rubidiumchlorid
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
s.c.	subcutan

Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U./Min	Umdrehungen pro Minute
v/v	volume/volume
w/v	weight/volume

Bei der Anfertigung des Schrifttumverzeichnisses wurden die Abkürzungen aus "World Medical Periodicals" (World Medical Association, 1961) genommen.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Literatur	3
2.1. Morphologische und chemische Bestandteile	3
2.2. Chemisch-physikalische Eigenschaften	4
2.3. Biologische Eigenschaften	5
2.3.1. Vermehrung von Adenoviren	5
2.3.2. Hämagglutination	10
2.3.3. Antigene Eigenschaften	11
2.3.4. Pathogenität	13
3. Eigene Untersuchungen	17
3.1. Materialien	17
3.1.1. Virus	17
3.1.2. Antiseren	17
3.1.3. Lösungen	18
3.2. Methoden	21
3.2.1. Zellkulturen	21
3.2.2. Biologische Testverfahren	21
3.2.2.1. Titration der Infektiosität	21
3.2.2.2. Neutralisationsversuche	22
3.2.2.3. Komplementbindungs-Reaktion	22
3.2.2.4. Hämagglutinationsversuche	23
3.2.2.5. Präzipitationsreaktionen in Agargelen	24
3.2.3. Virusvermehrung	25
3.2.3.1. Gewinnung und Lagerung von Saatvirus	25
3.2.3.2. Gewinnung großer Virusmengen	25
3.2.3.3. Ermittlung des Vermehrungsverhaltens	25

3.2.4.	Reinigung und Konzentrierung des Virus	26
3.2.4.1.	Die Reinigung mit Arcton 113	26
3.2.4.2.	Die Fällung mit Polyäthylenglykol 6000	27
3.2.4.3.	Die Konzentrierung durch Ultrazentrifugierung	27
3.2.4.4.	Die Gradientenzentrifugierung des cytopathogenen Agens	28
3.2.5.	Histologische Präparate	29
3.2.5.1.	Nachweis von Einschlußkörpern	29
3.2.5.2.	Färbung von Einschlußkörpern mit Fluorochromen	29
3.2.5.3.	Semi- und Ultradünnschnitte	30
3.2.6.	Chemisch-physikalische Verfahren	30
3.2.6.1.	Prüfung der Chloroformresistenz	30
3.2.6.2.	Thermostabilität und Einfluß von Kationen	30
3.2.6.3.	Prüfung der pH-Stabilität	31
3.2.6.4.	Der Einfluß von 5-Jod-2'-desoxyuridin auf die Vermehrung des cytopathogenen Agens	32
3.2.6.5.	Isolierung eines gruppenspezifischen löslichen Antigens durch Ionenaustauschchromatographie	32
3.2.2.6.	Die Proteine des cytopathogenen Agens	34
3.2.2.6.1.	Die Spaltung mit Natriumlaurylsulfat	34
3.2.2.6.2.	Die Trennung mit Polyacrylamidgelen	34
3.2.2.6.3.	Die Färbung der Gele	35
3.2.2.6.4.	Molekulargewichtsbestimmungen	36
3.2.6.7.	Die Markierung mit ^3H -Thymin	36
3.2.6.8.	Die Messung der Radioaktivität gereinigter und konzentrierter, ^3H -markierter Viruspräparationen	37
3.2.6.9.	Die Messung "säureunlöslicher Radioaktivität" nach Fällung und Filtration von ^3H -DNA	38

3.2.6.10.	Bestimmung der Dichte infektiöser Viruspartikeln	38
3.2.6.11.	Die Isolierung ^3H -markierter DNA und die Bestimmung ihrer Dichte	39
3.2.6.12.	Die enzymatische Verdauung isolierter, ^3H -markierter viraler DNA	40
3.2.6.13.	Die Berechnung des Guanin + Cytosin-Gehaltes viraler DNA aus ihrer Dichte in Cäsiumchlorid	41
3.2.6.14.	Die Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten $S_{20,w}$ infektiöser Partikeln	41
3.2.6.15.	Elektronenmikroskopie	43
3.2.7.	Infektionsversuche mit Schafen und kleinen Versuchstieren	43
3.3.	Ergebnisse	45
3.3.1.	Die Vermehrung des cytopathogenen Agens	45
3.3.2.	Entwicklung und Morphologie des CPE	47
3.3.3.	Entstehung und Aussehen von Einschußkörpern	48
3.3.3.1.	Lichtmikroskopische Untersuchung	48
3.3.3.2.	Elektronenmikroskopische Untersuchung	49
3.3.4.	Die Prüfung der Chloroformstabilität	50
3.3.5.	Die Prüfung der pH-Stabilität	51
3.3.6.	Die Thermostabilität des cytopathogenen Agens und der Einfluß von Ionen auf die Thermoinaktivierung	51
3.3.7.	Reinigung und Konzentrierung	52
3.3.7.1.	Die Fällung mit Polyäthylenglykol 6000	52
3.3.7.2.	Die Konzentrierung durch Ultrazentrifugierung in einem Festwinkelrotor	54
3.3.7.3.	Die Reinigung mit Arcton 113	54
3.3.7.4.	Die Konzentrierung durch Ultrazentrifugierung in Cäsiumchloridgradienten	54

3.3.8.	Die Bestimmung der Dichte infektiöser Partikeln	57
3.3.9.	Der Sedimentationskoeffizient $S_{20,w}$ infektiöser Viruspartikeln	59
3.3.10.	Der Nucleinsäuretyp des cytopathogenen Agens	59
3.3.10.1.	Die Färbung infizierter Zellkulturen mit Fluorochromen	59
3.3.10.2.	Die Hemmung der Virusvermehrung durch 5-Jod-2'desoxyuridin	60
3.3.10.3.	Der Einbau von ^3H -Thymidin	60
3.3.11.	Die Extraktion der Virusnucleinsäure und die Bestimmung ihrer Dichte	61
3.3.12.	Die enzymatische Verdauung isolierter DNA	63
3.3.13.	Die Proteine des cytopathogenen Agens	64
3.3.14.	Ergebnisse elektronenmikroskopischer Untersuchungen	64
3.3.15.	Hämagglutination	69
3.3.16.	Serologische Untersuchungen	69
3.3.16.1.	Präzipitationsreaktionen in Agargelen	69
3.3.16.2.	Die Untersuchung komplementbindender Eigenschaften des cytopathogenen Agens	71
3.3.16.3.	Isolierung eines gruppenspezifischen löslichen Antigens durch Ionenaustauschchromatographie	72
3.3.16.4.	Induktion neutralisierender Antikörper durch das cytopathogene Agens	74
3.3.16.5.	Die Unterscheidung des cytopathogenen Agens von bekannten Adenoviren des Schafes	75
3.3.17.	Pathogenität für Schafe und kleine Versuchstiere	76
3.4.	Besprechung der Ergebnisse	78
3.5.	Zusammenfassung	90
4.	Schrifttum	92

1. Einleitung

Die Gruppe der Adenoviren ist seit zwei Jahrzehnten bekannt (ROWE et al., 1953) und umfaßt eine Vielzahl morphologisch, chemisch-physikalisch und biologisch ähnlicher Viren, die bei Menschen, Säugetieren und Vögeln weit verbreitet sind.

Nachdem "Adenoviren" (ENDERS et al., 1956) erstmals aus adenoiden Zellen in "spontan" degenerierenden Gewebekulturen isoliert worden waren, erkannte man sie bald als Ursache von Erkrankungen, vor allem des Auges, des Atmungs- und des Verdauungstraktes, und viele Serotypen humaner und animaler Adenoviren wurden aus erkrankten Organismen isoliert. Eine große Zahl der zur Zeit bekannten Serotypen wurde jedoch aus Zellen, Geweben und Exkreten latent infizierter Menschen und Tiere isoliert und serologische Untersuchungen lassen die weite Verbreitung dieser Virusgruppe ohne klinische Manifestation erkennen.

Nach der Art des "natürlichen" Wirtssystems, aus dem sie ursprünglich isoliert wurden, gliedert man die Gruppe der Adenoviren in folgende Untergruppen auf:

1. Adenoviren des Menschen, 32 Serotypen (NORRBY, 1971)
2. Adenoviren des Affen, 23 Serotypen (CABASSO und WILNER, 1969)
3. Adenoviren des Rindes, 10 Serotypen? (KRETZSCHMAR, 1973)
4. Adenoviren des Schafes, 3 Serotypen (MC FERRAN et al., 1971)
5. Adenoviren des Schweines, 4 Serotypen (BIBRACK, 1969)
6. Adenoviren des Hundes, 2 Serotypen (SWANGO et al., 1969)
7. Adenoviren der Maus, 2 Serotypen (REEVES et al., 1967)
8. Adenoviren des Pferdes, Zahl der Serotypen nicht bestimmt
9. Adenoviren des Geflügels, Zahl der Serotypen nicht bestimmt

Die Isolierung eines Adenovirus aus den Nieren eines Frosches (*Rana pipiens*) wurde kürzlich berichtet (CLARK et al., 1973).

Obwohl man eine natürliche Infektion aller Säugetiere mit Adenoviren vermutet (CABASSO und WILNER, 1969) und DARBYSHIRE und PEREIRA schon 1964 vom Auftreten gruppenspezifischer Antikörper von Adenoviren in Seren von Schafen berichteten, wurde erstmals 1969 die Isolierung von Adenoviren aus Kotproben von Schafen bekannt (MC FERRAN et al., 1969). In einer weiteren Mitteilung berichteten dieselben Autoren 1971 von 9 Isolaten aus Kotproben von Lämmern, die sie auf Grund morphologischer, chemisch-physikalischer und serologischer Eigenschaften als Adenoviren charakterisierten. Vier der Isolate stammten von klinisch gesunden Lämmern, weitere vier von Lämmern mit Diarrhoe - von welchen jedoch 2 stark mit Strongyliden befallen waren - und ein weiteres von einem Lamm aus einer Herde, die respiratorische und enteritische Erkrankungen aufwies. Kreuzneutralisations-Versuche ergaben 3 serologisch unterschiedliche Typen, die sowohl von klinisch gesunden als auch von erkrankten Tieren isoliert worden waren.

Über die Isolierung und Charakterisierung eines weiteren Adenovirus-Serotyps aus dem Kot klinisch gesunder Lämmer soll in der vorliegenden Arbeit berichtet werden.

2. Literatur

2.1. Morphologie und chemische Bestandteile

Das Nucleocapsid der Adenoviren mißt zwischen 65 und 80 nm im Durchmesser, ist ohne äußere Hülle und hat die Form eines aus 252 Capsomeren aufgebauten Icosaeders (HORNE et al., 1959). Einzelne Capsomeren haben einen mittleren Durchmesser von 9,5 nm; 240 von ihnen liegen in den Dreiecksflächen sowie auf den Scheitellinien des Icosaeders, sind jeweils von 6 Capsomeren umgeben, weshalb sie "Hexone" genannt werden; zwölf Capsomeren bilden die Ecken und werden, da sie fünf Nachbarn haben, als "Pentone" bezeichnet (GINSBERG et al., 1966). Hexone werden als sphärische Gebilde (VALENTINE und PEREIRA, 1965) oder - was die tatsächliche Struktur wohl besser trifft - als polygonale Hohlzylinder (PETTERSON et al., 1967) beschrieben. Pentone sind keilförmig (LAVER et al., 1969; PETTERSON und HÖGLUND, 1969), etwas kleiner als Hexone und haben dünne Fortsätze unterschiedlicher Länge, die "Fibern" genannt werden. Die Fibern sind radial vom Zentrum des Partikels weggerichtet und haben an ihrem äußeren Ende knopfartige Verdickungen (VALENTINE und PEREIRA, 1965). Durch chemische (SMITH et al., 1965; LAVER et al., 1968) und physikalische (RUSSEL et al., 1967) Einflüsse kann das Capsid zerlegt werden; es treten dann - wie auch bei spontanem Zerfall - einzelne oder charakteristisch zusammengelagerte Untereinheiten des Capsids auf und das die Nucleinsäure enthaltende "Core" wird frei. Das Core hat eine unregelmäßige, sphärische Gestalt ohne bestimmbare Symmetrien (LAVER et al., 1969; STASNY et al., 1969) und seine Größe liegt in einem Bereich zwischen 40 und 45 nm (EPSTEIN et al., 1960; ARCHETTI und STEVE - BOCCIARELLI, 1963).

Die Nucleinsäure der Adenoviren ist eine Doppelstrang-Desoxyribonucleinsäure (DNA) mit einer Länge zwischen 11 und 13 nm (VAN DER EB und VAV KESTEREN, 1966; GREEN et al., 1967); durch ihr Molekulargewicht zwischen 12 und 25×10^6 Dalton ist sie zu 11,6 bis 13,5% an der Gesamtmasse des Virions beteiligt (GREEN und PINA, 1963). Ihre Flotationsdichte in Cäsiumchlorid (CsCl)-Gradienten liegt zwischen 1,708 und 1,720 g/ml (PINA und GREEN, 1965).

Die Proteine intakter Virionen konnten nach Zerlegung hochgereinigter Viruspräparate mit Natriumlaurylsulfat durch Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) getrennt werden. Während MAIZEL et al. (1968), LAVER et al. (1968) und LAVER (1970) von der Trennung 9 verschiedener Proteine berichten, wird von RUSSEL et al. (1971) die Trennung 5 verschiedener Proteine mitgeteilt. Drei dieser Proteine konnten Hexonen, Pentonen und Fibern zugeordnet werden, 2 weitere sollen Core-Proteine darstellen. EVERITT et al. berichten 1973 über die Trennung von mindestens 10 verschiedenen Proteinen.

Essentielle Lipide (ANDREWS und HORSTMANN, 1949) sind am Aufbau der Adenoviren nicht beteiligt.

2.2. Chemisch-physikalische Eigenschaften

Da Adenoviren keine essentiellen Lipide enthalten, sind sie unempfindlich gegen die Behandlung mit Äther (HUEBNER et al., 1954; ROWE et al., 1955) oder Chloroform (FELDMANN und WANG, 1961). Die wiederholte Behandlung mit Fluorocarbon (GESSLER et al., 1956) bedingt keinen Verlust an Infektiosität.

Adenoviren sind säurestabil; die Senkung des pH-Wertes auf 3,0 führt zu keinem Verlust der Infektiosität (GINSBERG, 1956; HAIG et al., 1964; KJELLEN, 1965; TANAKA, 1968).

In einem Temperaturbereich zwischen $+4^{\circ}\text{C}$ und $+37^{\circ}\text{C}$ sind Adenoviren relativ stabil (GINSBERG, 1956); bei Temperaturen über $+60^{\circ}\text{C}$ tritt in weniger als einer Minute ein vollständiger Infektiositätsverlust ein (OTTE, 1972). Die Inaktivierung bei $+50^{\circ}\text{C}$ wird durch die Anwesenheit von Na^{+} -Ionen verzögert, jedoch nicht durch Mg^{++} - oder Ca^{++} -Ionen (WALLIS et al., 1962).

Die Flotationsdicht intakter Virionen in CsCl- oder Rubidiumchlorid (RbCl)-Gradienten liegt bei 1,34 g/ml (GREEN, 1962; KÖHLER, 1962; BAUER et al., 1964; STÖHR und WIGAND, 1965; SMITH, 1965) mit geringen Unterschieden zwischen den einzelnen Serotypen auf Grund des unterschiedlichen Nucleinsäuregehaltes (PINA und GREEN, 1965). Leere Hüllen haben eine Flotationsdichte von 1,30 g/ml (KÖHLER, 1962; NORRBY et al., 1964). Die Sedimentationskonstante $S_{20,w}$ des Virions liegt zwischen 780 und 800 Svedberg, das Molekulargewicht wird auf ungefähr 175×10^6 Dalton geschätzt (GREEN, 1965, 1966).

2.3. Biologische Eigenschaften

2.3.1. Vermehrung von Adenoviren

Die Vermehrung von Adenoviren in Versuchstieren, zum Beispiel humaner Serotypen in Kolostrum-frei aufgezogenen Schweinen wird zwar berichtet (BETTS et al., 1962), jedoch wird im allgemeinen die Zellkultur verwendet. Hierbei besteht eine gewisse Artspezifität. Eine produktive Infektion

ist vorzugsweise in Zellen des natürlichen Wirtes möglich. Die Infektion von Zellen einer anderen Art als der natürlichen verläuft meist abortiv ohne Synthese infektiöser Viruspartikeln; aber auch nach der Infektion nicht-permissiver Zellen können einzelne Virusbausteine synthetisiert werden. Einige humane Adenoviren können sich mit "Helfer-Viren" wie dem Papovavirus SV 40 oder auch nach Hybridisierung mit der Nucleinsäure dieser Viren (RAPP und MELNICK, 1966) in solchen Zellen vermehren, in denen ihre alleinige Infektion abortiv verlaufen würde. Für zahlreiche Adenoviren des Menschen, des Affen, des Rindes sowie des Geflügels wurde die Fähigkeit nachgewiesen, in vitro und in vivo Zellen zu transformieren und Tumoren zu erzeugen (HUEBNER et al., 1962; TRENTIN et al., 1962; SCHLESINGER, 1969).

Adenoviren animaler Herkunft sind am besten in Zellkulturen der homologen Spezies zu vermehren (GINSBERG, 1962). Ein relativ breites Spektrum permissiver Zellen haben Adenoviren des Menschen, des Schweines und des Hundes. Als Zellkulturen können Primärkulturen und permanente Zelllinien verwendet werden. Fibroblasten-Kulturen sind weniger geeignet als Kulturen epitheloïder Zellen; am empfänglichsten sind primäre Nierenzell-Kulturen.

Die Infektion empfänglicher Zellen mit einer großen Zahl infektiöser Partikeln beginnt mit einer Adsorptionsphase, die bei Zellen in Suspensionskulturen bereits nach 30 Minuten abgeschlossen ist (LAWRENCE und GINSBERG, 1967; PHILIPSON et al., 1968). In dieser Phase scheint den Fibern besondere Bedeutung zuzukommen, da die Adsorption durch ein gegen die Fibern gerichtetes Serum gehemmt werden kann (PHILIPSON et al., 1968). Es ist ungeklärt, ob infektiöse Partikeln durch einen phagozytären Vorgang in das Cyto-

plasma eingeschleust werden (CHARDONNET und DALES, 1970) oder ob eine unmittelbare Penetration erfolgt (MORGAN et al., 1969). Auch dieser mit einem teilweisen Verlust struktureller Proteine verbundene Vorgang läuft schnell ab, da bereits 30 Minuten nach der Adsorption Partikeln an der Kernmembran oder im Inneren des Zellkernes gefunden werden. Über den Vorgang des "uncoating" der Virusnucleinsäure ist noch wenig bekannt; elektronenmikroskopische Aufnahmen lassen vermuten, daß die Partikeln innerhalb des Nucleus den viralen Cores entsprechen, jedoch ist unbekannt, ob aus diesen die Nucleinsäure vollständig freigesetzt wird. Die Synthese virusabhängiger Ribonucleinsäure setzt in Zellkulturen ungefähr 8 Stunden nach deren Infektion ein und wurde sowohl für produktive (KÖHLER und ODAKA, 1965; FLANAGAN und GINSBERG, 1964; ROSE et al., 1965) als auch für nichtproduktive (FUJINAGA und GREEN, 1967) Infektionen beschrieben. Wenig später wird in lytischen Infektionen ein virusspezifisches Protein gebildet, das "frühe P-Antigen", das dem in von Adenoviren induzierten Tumoren oder transformierten Zellen auftretenden T- oder Neo-Antigen zu entsprechen scheint; es ist ungewiß, ob es sich hier um ein strukturelles Virusprotein handelt. Virusnucleinsäure wird 2 bis 3 Stunden später gebildet; die wiederum 4 bis 5 Stunden später erfolgende Synthese struktureller Proteine scheint von der Entstehung der DNA abhängig zu sein (GREEN, 1962; WILCOX und GINSBERG, 1963; POLASA und GREEN, 1965; GINSBERG et al., 1967; MÄNTYJÄRVY und RUSSEL, 1969). Beide Komponenten, sowohl Nucleinsäure als auch strukturelle Proteine werden in großem Überschuß gebildet und nur 5 bis 10% werden in vollständige Viruspartikeln eingebaut (GREEN, 1962; WHITE et al., 1969). Polypeptide werden im Cytoplasma synthetisiert (THOMAS und GREEN, 1966; VELICE und GINSBERG, 1968;

VELICE und GINSBERG, 1970; HORWITZ et al., 1969) und innerhalb weniger Minuten in den Zellkern überführt (HAYASHI und RUSSEL, 1968), in dem der Zusammenbau kompletter Partikeln erfolgt. Dieser ist von der Bildung eines Proteins mit hohem Arginingehalt abhängig (ROUSE und SCHLESINGER, 1967; RUSSEL und BECKER, 1968), das ein "spätes P-Antigen" darstellt und vermutlich einem Core-Protein entspricht.

5-Fluordesoxyuridin (FdUrd) hemmt die DNA-Synthese und damit auch die Synthese viraler DNA durch die Blockierung der enzymatischen Synthese von Thymidylsäure, der Einbau von 5-Jod-2'-desoxyuridin (JdUrd) führt zur Synthese einer "falschen" DNA ohne normale Funktion; wird eine dieser Substanzen innerhalb von 7 Stunden nach der Infektion der Zellkultur zugegeben, so wird kein infektiöses Virus gebildet (HERRMANN, 1961; FLANAGAN und GINSBERG, 1962; GREEN, 1962).

Die Anhäufung von Viruspartikeln innerhalb des Zellkernes führt zur Entstehung intranucleärer Einschlusskörper, die in gefärbten Präparaten mit dem Lichtmikroskop sichtbar sind. Zuerst werden eosinophile Granula mit schwach negativer Feulgen-Reaktion sichtbar, später werden diese basophil und zeigen positive Feulgen-Reaktion. Es folgt die Bildung eines dichten Einschlusskörpers, der einen großen Teil des Nucleus einnimmt und der gegen die meist hyperchromatische Kernwand durch einen hellen Hof abgegrenzt ist (BOYER et al., 1957; PRIER und LE BEAU, 1958; GOODMAN et al., 1960). Färbungen mit Fluorochromen wie Acridinorange oder Coriphosphin lassen zu diesem Zeitpunkt die Anhäufung großer Mengen von DNA erkennen. Elektronenmikroskopisch sind in Ultradünnschnitten in vielen Zellkernen zahlreiche Viruspartikeln, oft in kristalliner Anordnung sichtbar (KJELLEN et al., 1955; LAGERMALM et al., 1957). Gelegentlich

sind Proteine in kristalliner oder parakristalliner Form vorhanden, deren Bedeutung noch unbekannt ist (LOW und PINNOCK, 1956; MORGAN et al., 1956; VALENTINE, 1960; MARTINEZ-PALOMO et al., 1967; SUN, 1972).

Die Freisetzung der Viruspartikeln aus dem Zellkern erfolgt entweder durch Aufbrechen der Kernmembran (MORGAN et al., 1956) oder durch Anhäufung in sich abschnürenden Ausstülpungen der Kernmembran (FONG et al., 1965).

In infizierten Zellkulturen in Einzellschicht entwickelt sich ein cytopathischer Effekt (CPE), der in seinem Aussehen typisch für eine Infektion mit Adenoviren ist (SYVERTON, 1961). Infizierte Zellen verlieren ihre Fortsätze, runden sich ab und lösen sich aus dem Zellverband. Meist sind mehrere von ihnen charakteristisch traubenähnlich auf der Zellkultur zusammengelagert; dies ist jedoch nicht mit dem sofortigen Zelltod verbunden, da in den abgelösten Zellen noch Stoffwechselaktivität nachgewiesen werden kann (STUART-HARRIS, 1958). Bei einigen humanen Serotypen entstehen oft auch große Lücken, die durch Schrumpfung nicht abgelöster Zellen verursacht werden. WIGAND und BAUER (1964) unterscheiden demnach einen Rundzelltyp, einen Retraktionstyp und einen Sondertyp des CPE, bei dem sich kleine granuliert Zellen ablösen. Dieser CPE ist ungefähr 35 bis 40 Stunden nach der Infektion der Zellkultur zu erkennen; der mit der vollständigen Zerstörung der Kultur verbundene Höhepunkt ist im Allgemeinen nach 3 bis 4 Tagen erreicht. Von ihm ist ein "früher cytopathischer Effekt" zu unterscheiden, den einige humane Adenoviren verursachen und der innerhalb von 8 Stunden nach der Infektion zur Ablösung der Kultur führt. Diese Erscheinung ist keine Folge der Virusvermehrung in den Zellen, da die Eklipse noch

nicht abgeschlossen ist, sondern sie ist auf die "Toxin-ähnliche" Wirkung der Pentone einiger humaner Serotypen zurückzuführen (KLEMPERER und PEREIRA, 1959; WILCOX und GINSBERG, 1961; NORRBY, 1966).

2.3.2. Hämagglutination

Zahlreiche Adenoviren besitzen die Eigenschaft, rote Blutkörperchen zu agglutinieren (ROSEN, 1958, 1960; ROSEN et al., 1962; BAUER und WIGAND, 1963; SCHMIDT et al., 1965). Als Spender für die Erythrozyten kommt in erster Linie die Art in Betracht, deren Zellen für eine Infektion in vitro empfänglich sind; jedoch können einzelne Serotypen Erythrozyten der verschiedensten Tierarten agglutinieren (ROSEN, 1969). Die Fähigkeit, rote Blutkörperchen verschiedener Spezies zu agglutinieren, wurde von ROSEN (1960) zur Einteilung humaner Serotypen in drei Untergruppen genutzt. Serotypen der Untergruppe I agglutinieren Affen-Erythrozyten, jedoch nicht die von Ratten; Serotypen der Untergruppe II vermögen Erythrozyten von Ratten, aber nicht die von Affen zu agglutinieren. Die Serotypen der Untergruppe III ergeben mit Erythrozyten von Ratten nur eine teilweise, mit denen von Affen jedoch keine Agglutination. Durch Zugabe heterotypischer Adenovirus-Antiseren, vorzugsweise von Serotypen, die ebenfalls der Untergruppe III angehören, aber auch solcher der Untergruppen I und II, kann die Agglutination verstärkt werden (ROSEN, 1960). Diese Verstärkung ist auch bei Serotypen der Untergruppe II, nicht aber der Untergruppe I möglich. Die hämagglutinierende Aktivität ist sowohl die Eigenschaft kompletter Virionen (BAUER et al., 1964) als auch einzelner Pentone oder Fibern oder deren Aggregate (NORRBY, 1969). Lösliche Adenoviruskomponenten, die

rote Blutkörperchen spontan agglutinieren, werden "vollständiges Hämagglutinin", solche, bei denen nur in Anwesenheit heterotypischer Antiseren Agglutination eintritt, werden "unvollständige Hämagglutinine" genannt (PEREIRA und DE FIGUEIREDO, 1962; BAUER und WIGAND, 1963; NORRBY, 1966; NORRBY und WADELL, 1967).

2.3.3. Antigene Eigenschaften

In Seren von Rekonvaleszenten oder von künstlich infizierten Menschen oder Tieren werden komplementbindende, neutralisierende, hämagglutinationshemmende und präzipitierende Antikörper gefunden. Komplementbindende Antikörper sind auf mindestens ein gruppenspezifisches Antigen zurückzuführen, das allen Adenoviren gemeinsam ist (HUEBNER et al., 1954; ENDERS et al., 1956) und sowohl mit homo- als auch heterotypischen Immunsereen eine Komplementbindungsreaktion (KBR) ergibt. Ausgenommen hiervon sind Adenoviren des Geflügels (ROWE und HARTLEY, 1962; KAWAMURA und TSUBAHARA, 1963; CLEMMER, 1964; NORRBY, 1969). Neutralisierende Antikörper reagieren typenspezifisch, obwohl bei humanen Serotypen auch Kreuzreaktionen möglich sind (RAFAJKO, 1964; WIGAND et al., 1965). Hämagglutinationshemmende Antikörper sind weitgehend typenspezifisch und werden neben Neutralisationsversuchen zur Typenbestimmung - vor allem humaner Serotypen - durch Hämagglutinations-Hemmungstests benutzt (ROSEN, 1960; BELL et al., 1960; ROSEN et al., 1962). Die Ergebnisse von Neutralisationsversuchen und Hämagglutinationshemmungs-Tests stimmen jedoch nicht in allen Fällen überein (WIGAND und FLIEDNER, 1968).

Die antigenen Eigenschaften der Adenoviren sind nicht allein an das Virion gebunden, sondern können auch in "löslichen Komponenten" nachgewiesen werden (VALENTINE und PEREIRA, 1965; NORRBY, 1966). Nach NORRBY (1969) werden intakte Virionen und leere Hüllen als "nicht lösliche Komponenten", die übrigen, langsamer sedimentierenden Virusbestandteile als "lösliche Komponenten" bezeichnet. Die löslichen Komponenten können mit verschiedenen Methoden voneinander getrennt werden (KLEMPERER und PEREIRA, 1959; PHILIPSON, 1960; WILCOX und GINSBERG, 1961; VALENTINE und PEREIRA, 1965; GINSBERG et al., 1966) und in weitgehend reiner Form auf ihre antigenen Eigenschaften untersucht werden. VALENTINE und PEREIRA (1965) und NORRBY (1966) konnten die löslichen Komponenten mit ihren antigenen Eigenschaften den Struktureinheiten intakter Virionen zuordnen und GINSBERG et al. (1966) schlugen zur Vereinheitlichung der Nomenklatur die Bezeichnungen "Hexon-Antigen", "Penton-Antigen" und "Fiber-Antigen" vor. Da jedoch mehrere unterschiedliche antigene Eigenschaften nachgewiesen werden konnten, wurden von NORRBY (1969) die Bezeichnungen "Hexon-, Penton- und Fiber-Komponenten" und die Bezeichnung einzelner Antigene dieser Komponenten mit griechischen Buchstaben vorgeschlagen.

Nach NORRBY (1969) sind bislang folgende Antigene (in unterschiedlicher Zahl für einzelne humane Serotypen und die Adenoviren verschiedener Spezies) nachgewiesen worden:

Hexon-Komponenten: ein gruppenspezifisches Antigen α , das allen Adenoviren, ausgenommen denen des Geflügels, gemeinsam ist und das durch KBR und Agargelpräzipitation nachweisbar ist; ein typenspezifisches Antigen ϵ , das im Gegensatz zu den Fiber-Komponenten neutralisierende, aber keine hämagglutinationshemmende Antikörper induziert.

Fiber-Komponenten: ein Antigen γ , das typenspezifisch ist, hämagglutinationshemmende Antikörper induziert und bei humanen Serotypen der Untergruppen I und II als vollständiges Hämagglutinin, bei denen der Untergruppe III jedoch als unvollständiges Hämagglutinin wirkt. Für die Untergruppe III wurde ein Antigen δ nachgewiesen, das sich mit heterotypischen Antikörpern verbinden und so - bei isolierten Fibern - ein vollständiges Hämagglutinin bilden kann.

Penton-Komponenten: isolierte Penton-Komponenten aller drei Untergruppen sind inkomplette Hämagglutinine, die durch heterotypische Antikörper in komplette umgewandelt werden können. Träger dieser Eigenschaft ist ein auf der Basis des Pentons liegendes, komplementbindende Antikörper induzierendes Antigen β , das von dem Antigen α der Hexone unterschieden wird. Da die Art der unvollständigen Hämagglutinine in vollständige umwandelnden Antiseren nicht an eine bestimmte Untergruppe gebunden ist, wird das Antigen β ebenfalls als gruppenspezifisch bezeichnet. Zusätzlich ist noch ein Antigen γ und bei der Untergruppe III das für diese charakteristische Antigen δ der isolierten Fibern vorhanden.

2.3.4. Pathogenität

a. Mensch. Infektionen des Menschen mit Adenoviren verlaufen meist klinisch inapparent und führen gewöhnlich nur bei Kindern und Jugendlichen zu Erkrankungen, die auch epidemisch verlaufen können, vor allem wenn diese in Schulen und Kasernen zusammenleben (SOHIER et al., 1965). Auch sporadische Erkrankungen Erwachsener sind möglich. Klinisch apparente Infektionen manifestieren

sich meist in akuten fieberhaften Erkrankungen des Rachenraumes, der Lungen, der Lidbindehäute und der lymphatischen Organe dieser Bereiche (ANDREWS et al., 1957). Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes (DUNCAN und HUTCHINSON, 1961) und des Nervensystems (ROOS et al., 1972) sind selten. Adenoviren können die Ursache epidemischer Keratokonjunktivitiden sein (JAWETZ, 1959; KJER und MORDHORST, 1961). Die Zuordnung einzelner Serotypen zu den verschiedenen Erkrankungsformen ist in gewissem Umfang möglich (HUEBNER, 1959).

Versuchstiere erkranken im allgemeinen nicht; jedoch konnten PEREIRA und KELLY (1957) eine latente Infektion in Kaninchen, GINSBERG (1962) die Erkrankung von Hamstern und BETTS et al. (1962) in kolostrumfrei aufgezogenen Schweinen eine Pneumonie verursachen. BETTINOTTI und STRAUB (1966) berichten von der experimentellen Infektion eines Kalbes, SINHA et al. (1960) von der Infektion eines Hundes mit humanen Adenoviren.

Nach ihren onkogenen Eigenschaften werden die Adenoviren des Menschen in 4 Untergruppen eingeteilt (HUEBNER, 1967; MC ALLISTER et al., 1969). Die Untergruppen A (Typen 12, 18 und 31) und B (Typen 3, 7, 14, 16 und 21) sind stark beziehungsweise schwach onkogen und vermögen - vor allem in neugeborenen Hamstern - Zellen in vivo zu transformieren, die Untergruppen C (1, 2, 5 und 6) und D (Typen 9, 10, 13, 15, 19 und 26) können Zellen von Ratten und Hamstern nur in vitro transformieren.

b. Affe. Natürliche Infektionen von Affen mit Adenoviren können zu respiratorischen und enteritischen Erkrankungen führen (TYRELL et al., 1960; BULLOCK, 1965; KIM et al., 1967; ENGSTER et al., 1969). Besondere Bedeutung kommt latent infizierten Affennieren zu, die zur Herstellung von Vakzinen verwendet werden (HULL et al., 1965). Auch einige Adenoviren der Affen haben onkogene Fähigkeiten (HULL et al., 1965) und können in neugeborenen Hamstern, Mäusen und Ratten Tumoren bilden.

c. Rind. Bovine Adenoviren sind weit verbreitet (KLEIN, 1962; DARBYSHIRE und PEREIRA, 1964) und wurden aus Tieren mit respiratorischen und enteritischen Erkrankungen isoliert, wobei sie vermutlich jedoch nur eine Hilfsursache sind (KRETZSCHMAR, 1973). Nur in Einzelfällen gelang es, mit Isolaten aus Rindern bei kolostrumfrei aufgezogenen oder neugeborenen Kälbern ähnliche, sehr schwache Krankheiterscheinungen zu erzeugen (MOHANTY und LILIE, 1965; DARBYSHIRE et al., 1966). Typ 3 verursacht Tumoren in neugeborenen Hamstern (DARBYSHIRE, 1966; GILDEN et al., 1967).

d. Schwein. Adenoviren des Schweines wurden aus dem Kot an Durchfall erkrankter Ferkel isoliert (HAIG et al., 1964), meist jedoch aus Nieren klinisch gesunder Schlachtschweine (BIBRACK, 1965; MAHNEL und BIBRACK, 1966; MAYR et al., 1967; HORZINEK und UEBERSCHÄR, 1966). Kolostrumfrei aufgezogene, künstlich infizierte Ferkel zeigten keine Krankheiterscheinungen (SHARPE und JESSET, 1967).

e. Hund. Der Erreger der Hepatitis contagiosa canis (RUBARTH, 1947) ist ein Adenovirus des Hundes (KAPSENBERG, 1959). Infektionen des Hundes können eine plötzlich auftretende, rasch verlaufende und oft tödlich endende Erkrankung verursachen, aber auch hier sind klinisch inapparente Infek-

tionen möglich (PARRY und LARIN, 1951; KUNISHI et al., 1960; CABASSO und WILNER, 1969). Klinische Erscheinungen sind hohes Fieber, Apathie, Erbrechen und Durchfall, oft auch eine Trübung der Cornea und der sogenannte "Zwingerhusten". Infizierte Füchse zeigen das Bild einer akuten Enzephalitis mit Konvulsionen, gefolgt von Lähmungen und Koma. Die Mortalität kann bis 40% erreichen (GREEN, 1931). Die natürliche Übertragung auf Kojoten und Wölfe wurde nachgewiesen (EVANS et al., 1950), die künstliche Infektion von Meerschweinchen (KAPSENSTEDT, 1958) und Säuglingsmäusen (KAPSENBERG, 1959) ist möglich.

f. Maus. Adenoviren der Maus können in Säuglingsmäusen tödlich verlaufende Erkrankungen verursachen, während sie in erwachsenen Mäusen nur die Bildung komplementbindender und neutralisierender Antikörper hervorrufen (HARTLEY und ROWE, 1960).

g. Pferd. Nach Untersuchungen von DAREYSHIRE und PEREIRA (1964) konnten in den Seren von 24% der von diesen Autoren untersuchten Pferden Antikörper gegen Adenoviren nachgewiesen werden. TODD (1969), PETZOLD und SCHMIDT (1971) und ARDANS et al. (1973) teilen die Isolierung von Adenoviren aus Lungen von Fohlen mit akuten respiratorischen Krankheitserscheinungen mit.

H. Geflügel. GAL (Gallus Adeno-Like)-Virus verursacht keine natürlichen Erkrankungen, jedoch Lebernekrosen in künstlich infizierten Küken (SHARPLESS und JUNGHERR, 1961). CELO (Chicken Embryo Lethal Orphan)-Virus ist vermutlich der Erreger der "quail bronchitis" und induziert Tumoren in Hamstern (SARMA et al., 1965).

3. Infektionstests und -methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Virus

Das zu untersuchende cytopathogene Agens wurde von Herrn Dr. K. Bauer (Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen) aus dem Kot klinisch gesunder Lämmer, die in der Türkei gezüchtet worden waren, isoliert. Das Isolat hatte zu Beginn der Arbeiten 2 Passagen in Zellkulturen aus Schafnieren-Zellen durchlaufen. Drei in Nordirland isolierte Serotypen von Adenoviren von Schafen wurden von Herrn Dr. J.B. Mc Ferran (Veterinary Research Laboratories Stormont, Belfast, Nordirland) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.1.2. Antiseren

Zwei ungefähr 40 kg schwere Merinoschafe wurden am 14. und 21. Tag nach der Infektion mit dem zu untersuchenden Virus nochmals mit infektiösem Zellkultur-Überstand durch intramuskuläre Injektion reinfiziert und nach weiteren 21 Tagen entblutet.

Zur Gewinnung von Hyperimmunseren von Kaninchen wurde durch wiederholte Behandlung mit Arcton 113 ¹⁾ und Ultrazentrifugierung gereinigtes und konzentriertes Virus mit dem gleichen Volumen von inkomplettem Freund'schem Adjuvans ²⁾

¹⁾ 1,1,2-Trichlortrifluoräthan rein;
Serva Entwicklungslabor, Heidelberg.

²⁾ Bacto-Adjuvant, Incomplete (Freund)
Difco Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A.

versetzt und mit einem Ultra-Turrax ¹⁾ 20 Sekunden lang bei 20.000 U./Min in einem Eiswasserbad gemischt. Solche Gemische wurden 3 ungefähr ein Jahr alten Kaninchen dreimal in wöchentlichem Abstand intramuskulär injiziert. Zwei Wochen nach der letzten Injektion wurden die Kaninchen durch Herzpunktion entblutet. Antiseren gegen 3 in Nordirland isolierte Serotypen von Adenoviren von Schafen wurden von Herrn Dr. J.B. Mc Ferran, ein Mischserum gegen Adenoviren des Menschen von Herrn Prof. Dr. R. Wigand (Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.1.3. Lösungen ^{2) 3)}

Alsever-Lösung

Dextrose	2,050 g
Na-Citrat	0,800 g
Citronensäure	0,055 g
NaCl	0,420 g
Aqua dest. ad	100 ml

¹⁾ Janke und Kunkel KG, Fabrik chem. phys. Apparate, Staufen i. Br.

²⁾ Substanzen, die keinen besonderen Vermerk haben, wurden von der Firma E. Merck AG, Darmstadt, bezogen.

³⁾ Messungen des pH-Wertes wurden mit einem elektronischen Gerät durchgeführt: pH-Meter E 150 A, Methrom AG, Herisau, Schweiz.

Anzuchtmedium

SERVA-Pulvermedium PM 13 nach Angaben des Herstellers ¹⁾ + 10% (v/v) Kälberserum.

E-Puffer (10-fach)

0,40 M Tris-Acetat pH 7,2

0,20 M Na-Acetat + 3 H₂O

0,01 M EDTA

pH 7,2 mit Eisessig einstellen

M/90 NaCl-Phosphatpuffer pH 7,6

NaCl	7,2 g
Na ₂ HPO ₄ + 12 H ₂ O	6,4 g
KH ₂ PO ₄	0,35 g
Aqua bidest. ad	1000 ml

PBS pH 7,4

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ + 2 H ₂ O	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
CaCl ₂	0,1 g
MgCl ₂ + 6 H ₂ O	0,1 g

PBS - T pH 7,2

PBS + 0,25% (w/v) Trypsin ²⁾

1) Serva Entwicklungslabor, Heidelberg.

2) Trypsin 1 : 250 "Gifco"
 Gifco Laboratories, Detroit, Michigan,

SSC-Lösung

0,15 M NaCl

0,015 M Trinatriumcitrat pH 7,2

TEN-Puffer

Tris	6,075 g
EDTA	0,186 g
NaCl	5,8 g
Aqua bidest. ad	1000 ml
pH 7,5 mit 1N HCl ¹⁾ einstellen.	

Versen-Trypsin pH 6,4

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
EDTA	1,25 g
Trypsin	1,25 g

Allen in der Zellkultur verwendeten Lösungen wurden folgende Antibioticamengen zugesetzt:

Penicillin ²⁾	500 i.E./ml
Streptomycin ³⁾	0,1 mg/ml.

¹⁾ Fixanal 1N HCl, Riedel de Haen, Seelze-Hannover.

²⁾ Penicillin zur Injektion, Chemie Grünenthal GmbH Stolberg im Rheinland.

³⁾ Streptomycin zur Injektion, Bayer, Leverkusen.

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkulturen

Als Wirtszellen für das zu untersuchende cytopathogene Agens dienten einschichtige primäre - gelegentlich auch sekundäre - Zellkulturen aus Nierenepithelien 4 bis 5 Monate alter Schlachtschafe, die mit den üblichen Trypsinierungstechniken hergestellt wurden. Das gewonnene Zellsediment wurde routinemäßig 1 proz. (0,6 bis 0,8 x 10⁶ Zellen pro ml) in Anzuchtmedium suspendiert. Diese Zellsuspension wurde in folgenden Mengen in die verschiedenen Glasgefäße gegeben:

Roux-Schalen:	80 - 100 ml
Vierkantflaschen:	15 ml
Gewebekulturröhrchen:	1,5 ml
Leightonröhrchen:	2 ml.

Die Anzüchtung erfolgte stationär bei +37⁰ C im Brutschrank. Nach 2 Tagen wurde das Anzuchtmedium durch neues ersetzt und nach weiteren 5 bis 6 Tagen hatte sich ein einschichtiger Zellrasen gebildet. Das Anzuchtmedium wurde abgezogen und durch das gleiche Medium - jedoch ohne Kälberserum - ersetzt.

3.2.2. Biologische Testverfahren

3.2.2.1. Titration der Infektiosität

Zur Bestimmung der Infektiosität einzelner Proben wurde die Endpunkt-Verdünnungsmethode angewandt. Die Proben wurden in Potenzen von 10 in isotonischem M/90 NaCl-phosphatpuffer pH 7,6 verdünnt und mit jeder Verdünnungs-

stufe fünf Gewebekulturröhrchen beimpft. Die Impfdosis betrug 0,1 ml pro Röhrchen. Die Ablesungen erfolgten bis zum zehnten Tag nach der Infektion. Nur die Proben, die einen eindeutigen CPE zeigten, wurden gewertet. Die Titer wurden nach KÄRBER (1931) berechnet und sind als 50% kulturinfektiöse Dosen pro 0,1 ml ($KID_{50}/0,1$ ml) angegeben.

3.2.2.2. Neutralisationsversuche

Es wurde sowohl nach der Virus- als auch nach der Serumverdünnungsmethode gearbeitet. Bei beiden Methoden waren die verwendeten Seren 30 Minuten bei $+56^{\circ}$ C inaktiviert worden. Verdünnungen wurden mit isotonischen M/90 NaCl-Phosphatpuffer pH 7,6 durchgeführt.

Bei der Virusverdünnungsmethode wurde zu einer konstanten Serumverdünnung das gleiche Volumen des in Potenzen von 4 abgestuften Virusmaterials gegeben.

Bei der Serumverdünnungsmethode wurden die Seren in Potenzen von 4 verdünnt und mit dem gleichen Volumen einer konstanten Virusverdünnung, die einen Virusgehalt von 150 bis 250 $KID_{50}/0,1$ ml hatte, vermischt.

Bei beiden Verfahren kamen die Gemische 30 Minuten lang bei $+37^{\circ}$ C ins Wasserbad. Anschließend wurde die Neutralisation durch Abkühlen in Eiswasser gestoppt und von jeder Verdünnungsstufe wurden 5 Gewebekulturröhrchen mit jeweils 0,1 ml beimpft. Parallel verlaufende Viruskontrollen enthielten Puffer anstelle von Serum und wurden wie oben beschrieben behandelt. Neutralisationstiter wurden nach KÄRBER (1931) berechnet und sind auf 0,1 ml der Reaktionsgemische bezogen.

3.2.2.3. Komplementbindungs-Reaktion

Zum Nachweis komplementbindender Antigene wurde die Komplementbindungs-Reaktion (KBR) benutzt. Verdünnungen

wurden mit KBR-Puffer mit einer Zusatz von 0,1% Gelatine (OSLEP et al., 1948) durchgeführt. Die KBR erfolgte in Röhrchen von 7,5 cm Länge und 1 cm Durchmesser. Als Komplement wurden Meerschweinchen-Seren verwendet, hämolytisches System bestand aus 2% Hammelerythrozyten und 1 : 4000 verdünntem hämolytischem Ambozeptor¹⁾. Das hämolytische System wurde vor der Anwendung 30 Minuten lang bei +37° C im Wasserbad aufbewahrt. Zur Anwendung kamen 2 Komplementeinheiten. Bindung und Lysis erfolgten in jeweils 30 Minuten bei +37° C im Wasserbad. Zur Ablesung wurden die Röhrchen 5 Minuten lang bei 2.000 U./Min zentrifugiert. Die letzte der in Potenzen von zwei durchgeführten Verdünnungen, die eine vollständige Hemmung der Hämolyse (++++ - Hämolyse) zeigte, wurde als positiv gewertet.

Wurde infektiöser Zellkultur-Überstand als Antigen eingesetzt, so wurde dieser einer Reinigung mit Arcton 113 unterzogen. Andere Antigenpräparationen wurden unbehandelt eingesetzt. Kaninchen-Hyperimmunserum wurde 1 : 10 verdünnt und 20 Minuten lang bei +65° C inaktiviert.

3.2.2.4. Hämagglutinationsversuche

Zum Nachweis hämagglutinierender Eigenschaften des cytopathogenen Agens wurde das von ROSEN (1958) für Adenoviren des Menschen eingeführte Verfahren benützt.

Hämagglutinationsversuche wurden mit 0,25 bis 1,0 proz. Suspensionen von Ratten-, Mäuse-, Meerschweinchen-, Hammel-, Geflügel- und Menschenerythrozyten (Blutgruppe O) in 0,85 proz. NaCl-Lösung oder in NaCl-Phosphatpuffer

1)

Ambozeptor Anti Sheep-Hemolysin 1 : 4000
Behringwerke AG, Marburg.

der pH-Werte 6,5, 7,0 und 7,5 durchgeführt. Vor der Anwendung wurden die in Alsever-Lösung aufgenommenen Erythrozyten dreimal in der jeweils verwendeten Lösung gewaschen. Die Versuche wurden in den bei der KBR beschriebenen Röhrchen durchgeführt.

Zu jeweils 0,4 ml der in Potenzen von 2 fortlaufend verdünnten Viruspräparationen wurde 0,1 ml der Erythrozytensuspension zugefügt, durchgemischt und das Ergebnis nach 1, 4, und 18 Stunden bei $+37^{\circ}\text{C}$, $+22^{\circ}\text{C}$ und $+4^{\circ}\text{C}$ beurteilt. Die Versuche wurden mit infektiösem Zellkultur-Überstand (4,7 KID₅₀/0,1 ml) und konzentrierten Viruspräparationen (7,3 KID₅₀/0,1 ml) durchgeführt.

3.2.2.5. Präzipitationsreaktionen in Agargelen

Präzipitationsreaktionen in Agargelen wurden nach der von OUCHTERLONY (1948) beschriebenen Doppeldiffusionsmethode durchgeführt.

In Plastikschälchen ¹⁾ mit einem Durchmesser von 5 cm wurde fünf ml einer durch Erwärmen im Wasserbad verflüssigten Lösung von 1% (w/v) Agar ²⁾ und 0,4% (w/v) Na-Azid in Aqua bidest. gegossen. Nach dem Erstarren des Agars wurde mit einem Edelstahlröhrchen die für den jeweiligen Versuch erforderliche Zahl von Löchern mit einem Durchmesser von 0,4 cm ausgestanzt und mit den zu untersuchenden Proben gefüllt. Die Schälchen wurden bei Zimmertemperatur in einer feuchten Kammer aufbewahrt.

1) Plastikschälchen, oberflächenbehandelt, Ø 50 mm;
Fa. Greiner & Söhne, Nürtingen/Württ.

2) Special Agar Noble
Difco Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A.

3.2.3. Virusvermehrung

3.2.3.1. Gewinnung und Lagerung von Saatvirus

Zur Gewinnung von Virussuspensionen mit hohem Titer als Ausgangsmaterial für weitere Virusvermehrungen wurden infizierte Schafnieren-Zellkulturen in Roux-Schalen so lange bei +37° C bebrütet, bis sich ein vollständiger CPE ausgebildet hatte. Nach niedertourigem Abzentrifugieren zellulärer Bestandteile (Stock Zentrifuge ¹⁾, 3.000 U./Min, 2.200 x g) wurde die Zellkultur-Flüssigkeit in Portionen von 5 ml abgefüllt und bis zu ihrer Verwendung bei -65° C eingefroren.

3.2.3.2. Gewinnung großer Virusmengen

Zur Gewinnung großer Virusmengen wurde bei dichtgewachsenen Kulturen von Schafnierenzellen das Anzuchtmedium entfernt, die Kulturen mit Saatvirus infiziert und ca. 80 ml Erhaltungsmedium je Roux-Schale hinzugegeben. Nachdem sich nach Bebrütung bei +37° C ein deutlicher CPE entwickelt hatte, wurde der Zellrasen mit einem Gummischaber von der Zellwand abgelöst, und größere zelluläre Bestandteile wurden niedertourig abzentrifugiert. Dieses Zellsediment wurde in 2 ml TEN-Puffer, pH 7,5, je Roux-Schale aufgenommen und bei -20° C eingefroren, der infektiöse Zellkultur-Überstand bis zur weiteren Verwendung bei +4° C aufbewahrt.

3.2.3.3. Ermittlung des Vermehrungsverhaltens

Um das Vermehrungsverhalten des cytopathogenen Agens in der Zellkultur zu untersuchen, wurde ein dem von LIEBER-

1)

Fa. Wilhelm Stock, Marburg.

MAN und FRIEDMAN (1959) für Adenoviren des Menschen beschriebenen ähnliches Verfahren angewandt. Schafnieren-Zellkulturen in Vierkantflaschen (jeweils ca. 5×10^6 Zellen) wurden mit ungefähr 2 infektiösen Einheiten pro Zelle infiziert. Nach einer Adsorptionszeit von 6 Stunden bei $+37^{\circ}\text{C}$ wurde nicht-adsorbiertes Virus dreimal mit eiskaltem Erhaltungsmedium abgewaschen und dann wurden 10 ml Erhaltungsmedium in jede Vierkantflasche gegeben. Sechs, 12, 24, 36 und 48 Stunden nach der Infektion (p.i.) wurde von je 2 Vierkantflaschen der Zellkultur-Überstand abgenommen, niedertourig zentrifugiert und von zellulären Bestandteilen getrennt. Dieses Sediment wurde mit Erhaltungsmedium gewaschen, abzentrifugiert und, nachdem der Überstand verworfen worden war, zu den in den Vierkantflaschen verbliebenen Zellen gegeben. Diese wurden mit je 10 ml Erhaltungsmedium überschichtet und - wie auch der zuerst abgenommene infektiöse Zellkultur-Überstand - dreimal kurz hintereinander bei -65°C eingefroren und wieder aufgetaut. Wieder wurden Zellbestandteile abzentrifugiert, die Überstände beider Vierkantflaschen gemischt und die Infektiosität dieser Probe wie auch die des ursprünglichen Zellkultur-Überstandes durch Titration in Gewebekulturröhrchen ermittelt.

3.2.4. Reinigung und Konzentrierung des Virus

3.2.4.1. Die Reinigung mit Arcton 113

Konzentrierter infektiöser Zellkultur-Überstand oder einmal eingefrorenes und wieder aufgetautes Zellsediment wurden mit einem gleichen Volumen Arcton 113 versetzt und 20 Minuten lang bei $+4^{\circ}\text{C}$ in einer Schüttelmaschine geschüttelt. Die Phasentrennung erfolgte anschließend durch Zentrifugierung in der Stock-Zentrifuge (10 Minuten, 3.000 U./Min $2.200 \times g$). Die über der Interphase befindliche Virussuspension wurde abgenommen, der Rest ohne weitere Extraktion verworfen.

3.2.4.2. Die Fällung mit Polyäthylenglykol 6000

Infektiösen Zellkultur-Überstand, der durch niedertourige Zentrifugierung vorgeklärt worden war, wurde in Tris-HCl-Puffer (0,1 M, pH 7,5) vorgelöstes Polyäthylenglykol 6000 (PEG 6000) ¹⁾ unter Rühren bis zu einer Endkonzentration von 10% (w/v) zugesetzt. Nach weiterem zweistündigem Rühren bei +4° C wurde die Suspension über Nacht im Kühlraum aufbewahrt, dann das ausgefallene Material 30 Minuten lang in der Stock-Kühlzentrifuge bei 3.000 U./Min (2.200 x g) sedimentiert und anschließend dreimal jeweils 20 Minuten lang bei +4° C mit einer solchen Menge TEN-Puffer, pH 7,5, eluiert, daß eine hundertfache Einengung des Ausgangsvolumens erzielt wurde. Die Eluate wurden gesammelt und nach einer Behandlung mit Arcton 113 bei +4° C aufbewahrt.

3.2.4.3. Die Konzentrierung durch Ultrazentrifugierung

Niedertourig vorgeklärter infektiöser Zellkultur-Überstand wurde in einem Rotor 19 in einer Ultrazentrifuge Spinco L3 - 50 ²⁾ 60 Minuten lang bei 19.000 U./Min (35.800 x g) bei +4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen, das entstandene Pellet in einer solchen Menge TEN-Puffer, pH 7,5, aufgenommen, daß eine Konzentrierung um den Faktor 100 erfolgte. Nach einer Behandlung mit Arcton 113 wurde die erhaltene Virussuspension bis zur weiteren Verwendung bei +4° C aufbewahrt.

¹⁾ Polyäthylenglykol 6000; Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt (Main).

²⁾ Fa. Beckman, Palo Alto, California, U.S.A.

3.2.4.4. Die Gradientenzentrifugierung des cytopathogenen Agens

Um die aus Zellkultur-Material, durch Fällung mit PEG 6000 oder durch Sedimentation im Rotor 19 erhaltenen Virussuspensionen nach Behandlung mit Arcton 113 weiter zu reinigen und zu konzentrieren, wurde eine Gradientenzentrifugierung in CsCl-Gradienten durchgeführt. Hierzu wurde ein dem von GREEN und PIÑA (1962) beschriebenen ähnliches Verfahren angewandt.

In Nitrozellulosebecher des Rotors SW 25.1 wurden 18 ml der Virussuspension eingefüllt und diese mit jeweils 6 ml CsCl-Lösungen der Dichten 1,30 g/ml und 1,40 g/ml unterschichtet. Die Lösungen von CsCl in TEN-Puffer, pH 7,5, waren mit Hilfe eines Refraktometers ¹⁾ und einer Eichkurve hergestellt worden. Nach einer 90 Minuten dauernden Zentrifugierung in einem Rotor SW 25.1 bei 24.000 U./Min (p_i 7,0 x 10⁸) und einer Temperatur von +4° C in einer Ultrazentrifuge Spinco L2 wurde der Boden der Becher mit einer Kanüle angestochen, die im Streulicht deutlich sichtbaren Virusbanden gewonnen und in Nitrozellulosebecher des Rotors SW 65 (Titan) aufgenommen. In diesen wurde durch Zugabe von gesättigter CsCl-Lösung in TEN-Puffer, pH 7,5, und von reinem Puffer eine Dichte von 1,34 g/ml eingestellt. Darauf erfolgte eine Zentrifugierung in einem Rotor SW 39 L (p_i 17,6 x 10⁸) für 20 Stunden bei 35.000 U./Min in einer Ultrazentrifuge Model Spinco L2. Am Ende des Laufes wurde der Inhalt der Becher nach Punktion des Becherbodens mit einer Kanüle in Fraktionen abgenommen oder die im Streulicht deutlich sichtbare Virusbande wurde direkt mit der Kanüle abgesaugt.

¹⁾ Fa. Zeiss, Oberkochen/Württ.

3.2.5. Histologische Präparate

3.2.5.1. Nachweis von Einschlusskörpern

Zum Nachweis von Einschlusskörpern in infizierten Zellen wurden Zellkulturen in Leightonröhrchen mit Bouin'scher Lösung ¹⁾ fixiert und mit einer Phloxin-Tartrazin-Färbung in der von ROLLE und MAYR (1966) angegebenen Weise gefärbt. Die Betrachtung der gefärbten Präparate und die Anfertigung photomikroskopischer Aufnahmen erfolgte mit einem Photomikroskop ²⁾.

3.2.5.2. Färbung von Einschlusskörpern mit Fluorochromen

Zur Bestimmung des Nucleinsäuretyps in durch das cytopathogene Agens verursachten Kerneinschlusskörpern wurden infizierte Zellkulturen in Leightonröhrchen mit den Fluorochromen Acridinorange ³⁾ nach der Methode von VAYOR und DIWAN (1961) oder Coriophosphin ⁴⁾ nach der von KEEBLE und JAY (1962) angegebenen Methode gefärbt. Die Betrachtung der Präparate und die Anfertigung fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop ⁵⁾ (Erregerfilter KP 500, BG 38, Sperrfilter 53).

1)

Waren für die erforderlichen Lösungen keine besonderen Angaben gemacht, so wurden diese nach den Rezepturen von ROMEIS (1968) angefertigt.

2)

Photomikroskop II; Fa. Zeiss, Oberkochen/Württ.

3)

Chroma-Gesellschaft Schmid und Co., Stuttgart.

4)

Chroma-Gesellschaft Schmid und Co., Stuttgart.

5)

Fluoreszenzmikroskop Standard RA;
Fa. Zeiss, Oberkochen/Württ.

3.2.5.3. Semi- und Ultradünnschnitte

Die Anfertigung von Semi- und Ultradünnschnitten infizierter Zellkulturen wurde freundlicherweise von Herrn Privatdozent Dr. S. Ueberschär durchgeführt.

Bei allen histologischen Untersuchungen infizierter Zellkulturen wurden nicht infizierte Kulturen in gleicher Weise untersucht.

3.2.6. Chemisch-physikalische Verfahren

3.2.6.1. Prüfung der Chloroformresistenz

Zur Prüfung der Chloroformresistenz des cytopathogenen Agens wurde das von BÖGEL und MAYR (1961) zur Prüfung der Chloroformresistenz von Enteroviren beschriebene Verfahren angewandt.

Niedertourig vorgeklärter infektiöser Zellkultur-Überstand wurde in 2 Schüttelgefäße aufgeteilt und zu einer Hälfte der Probe 10% (v/v) Chloroform p.a. gegeben. Beide Proben wurden 60 Minuten lang bei +4° C in einer Schüttelmaschine geschüttelt, dann über Nacht bei +4° C stehen gelassen und nach kurzem Aufschütteln bei 3.000 U./Min (2.200 x g) zentrifugiert. Von der mit Chloroform versetzten Probe wurde die sich über dem Chloroform und einer schmalen Zwischenschicht befindende Virussuspension vorsichtig abgenommen und ihre Infektiosität wie auch die der als Kontrolle dienenden unbehandelten Probe ermittelt.

3.2.6.2. Thermostabilität und der Einfluß von Kationen

Die Prüfung des Einflusses ein- und zweiwertiger Kationen

auf die Inaktivierung des cytopathogenen Agens durch Wärme wurde nach dem von WALLIS et al. (1961) beschriebenen Verfahren durchgeführt.

Von niedertourig vorgeklärtem Zellkultur-Überstand wurden 4 Proben genommen; von diesen blieb eine ohne Zusatz, zu einer wurde das gleiche Volumen doppelt destillierten Wassers und zu den beiden anderen das gleiche Volumen einer 2 M NaCl- oder einer 2 M $MgCl_2$ -Lösung in Aqua bidest. gegeben und durchmischt. Alle Proben wurden 60 Minuten in ein Wasserbad von $+50^{\circ}C$ gestellt. Vor und nach dem Erwärmen wurden sie in Eiswasser aufbewahrt. Die Infektiosität der Proben wurde in der üblichen Weise ermittelt, jedoch wurde von den 3 verdünnten Proben das doppelte Volumen verimpft. Um einen cytotoxischen Einfluß der Salzlösungen auf die Zellkulturen zu kontrollieren, wurden diese 1 : 10 mit Erhaltungsmedium verdünnt und diese auf jeweils 5 Gewebekulturröhrchen gegeben.

Eine weitere Probe von infektiösem Zellkultur-Überstand wurde 30 Minuten lang bei $+60^{\circ}C$ im Wasserbad erwärmt. Nachdem sie vor und nach dem Erwärmen in einem Eiswasserbad gekühlt worden war, wurde ihre Infektiosität ermittelt. Eine Kontrolle war nur in Eiswasser aufbewahrt worden.

3.2.6.3. Prüfung der pH-Stabilität

Um die Stabilität des cytopathogenen Agens im sauren pH-Bereich zu prüfen, wurde infektiösem Zellkultur-Überstand tropfenweise 0,5 N HCl in PBS zugesetzt, bis ein pH-Wert von 3,0 erreicht war. In das gleiche Volumen einer Kontrolle wurde die gleiche Tropfenzahl PBS gegeben. Als weitere Kontrolle diente ein an Zellkulturen adaptiertes Virus der Maul- und Klauenseuche. Die Messung der pH-Werte erfolgte mit einem pH-Meter bei Zimmertemperatur. Nach einer dreistündigen Lagerung der Proben bei $+4^{\circ}C$ wurde ihre Infektiosität durch Titration ermittelt.

3.2.6.4. Der Einfluß von 5-Jod-2'desoxyuridin auf die Vermehrung des cytopathogenen Agens

Infektiösem Zellkultur-Überstand wurde in doppelt destilliertem Wasser gelöstes JdUrd ¹⁾ zugesetzt, bis dieses eine Molarität von 10^{-4} erreicht hatte. Eine Kontrolle enthielt zusätzlich 80 µg/ml Thymidin ²⁾. Als weitere Kontrolle diente ein an Zellkulturen adaptiertes Virus der Maul- und Klauenseuche, das entsprechend behandelt worden war. Diese wie auch unbehandelte Proben wurden auf Zellkulturen verimpft und ihre Infektiosität ermittelt.

3.2.6.5. Isolierung eines gruppenspezifischen löslichen Antigens durch Ionenaustauschchromatographie

Um das cytopathogene Agens auf das Vorhandensein eines gruppenspezifischen löslichen Antigens zu untersuchen und um dieses zu isolieren, wurde ein von GINSBERG (1969) bei verschiedenen Serotypen humaner Adenoviren angewandtes Verfahren der Ionenaustauschchromatographie durchgeführt.

Als Probenmaterial dienten Extrakte infizierter Zellkulturen, aus denen durch eine 90 Minuten dauernde Zentrifugierung durch zweistufige CsCl-Gradienten der Dichten 1,30 und 1,40 g/ml im Rotor SW 25.1 bei 24.000 U./Min (p_i 7,0 x 10^8) in einer Ultrazentrifuge Spinco L2 komplettes Virus und leere Hüllen entfernt worden waren. Dieses Material wurde durch Vakuumdialyse auf den 10. Teil seines Ausgangsvolumens eingeeengt und vor seiner weiteren Verwendung 24 Stunden lang gegen entgasten 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,2, dialysiert.

1)

Serva Entwicklungslabor, Heidelberg.

2)

Serva Entwicklungslabor, Heidelberg.

Vorgequollene DEAE-Zellulose ¹⁾ wurde mit 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,2, äquilibriert, evakuiert und in eine Chromatographieröhre mit einem Durchmesser von 1,25 cm gefüllt. Die Packung der Säule erfolgte unter dem vom Hersteller der DEAE-Zellulose angegebenen Druck mit einer peristaltischen Pumpe ²⁾. Bei einer Säulenhöhe von 15 cm betrug ihr Volumen ungefähr 18 ml. Unmittelbar vor Gebrauch wurde die Säule mit dem Vielfachen ihres Volumens mit entgastem 0,01 M Phosphatpuffer gespült. Nach dem Aufsetzen einer Probe mit einem Volumen von 3 ml wurde mit 20 ml des gleichen Puffers gespült und anschließend mit einem linearen Ionenstärkegradienten, der durch Mischen von 100 ml 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,2, und von 100 ml 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,2, mit 0,5 M NaCl in einem Gradientenmischer ³⁾ hergestellt wurde, bei Zimmertemperatur eluiert. Mit einer peristaltischen Pumpe wurde eine Durchflußgeschwindigkeit von 35 ml pro Stunde bewirkt. Das Eluat wurde in Fraktionen von je 5 ml mit einem automatischen Sammler ³⁾ aufgefangen, seine Extinktion mit einer UV-Zelle ⁴⁾ bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen und diese mit einer Schreibvorrichtung registriert. Fraktionen, die eine Extinktion aufwiesen, wurden gesammelt und ihr Volumen durch Vakuumdialyse gegen den obengenannten Puffer eingengt.

1) Microgranular (pre-swollen) Anion Exchanger for Column-Chromatographie DE 52
W. and R. Balston (Modified Cellulose) Ltd.
Maidstone/Kent, England.

2) LKB-Produkte, Sweden.

3) Fraktionssammler: Ultrorac^R Fraction Collector
LKB-Produkte, Sweden.

4) Uvicord, LKB-Produkte, Sweden.

3.2.6.6. Die Proteine des cytopathogenen Agens

Zur Spaltung von Virusproteinen mit Natriumlaurylsulfat und ihrer Trennung mit Polyacrylamid-Gelen wurde im Wesentlichen ein von BAUER und BOLOGNESI (1970) beschriebenes Verfahren angewandt.

3.2.6.6.1. Die Spaltung mit Natriumlaurylsulfat

Gereinigtes und konzentriertes Virusmaterial wurde über Nacht gegen E-Puffer dialysiert, dann mit 1% (w/v) Natriumlaurylsulfat (durch 2 Stunden langes Sieden in Äthanol p.a. umkristallisiert), 0,1 M Dithiothreitol (DTT) ²⁾ sowie 20 µl Glycerin + Phenolrot versetzt und 1 Minute lang in einem Wasserbad von 100° C erhitzt.

3.2.6.6.2. Die Trennung mit Polyacrylamidgelen

Zehnprozentige Gele waren nach folgendem Ansatz (für jeweils 10 Gele) hergestellt worden:

Aqua bidest.	8,5	ml
10 x E-Puffer	3,8	ml
Acrylamid ³⁾ + 0,4% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid ⁴⁾ in Aqua bidest.	25,4	ml
Tetramethyläthylendiamin ⁵⁾	0,04	ml
Natriumlaurylsulfat 10% (w/v) umkristallisiert in E-Puffer	0,37	ml
1 M DTT	0,03	ml
Ammoniumpersulfat ⁶⁾ (50 mg/ml in Aqua bidest.)	0,1	ml

1) Schuchardt, München

2) Cleland's reagent (dithiothreitol) A grade
Cal Biochem; San Diego, Calif., U.S.A.

3) 4) 5) 6)

Serva Entwicklungslabor, Heidelberg.

Diese Mischung wurde in mit Parafilm ¹⁾ verschlossene und in eine Trennkammer eingespannte Glasröhrchen von 9,5 cm Länge und 0,6 cm Durchmesser gegossen und mit einer geringen Menge Aqua bidest. überschichtet. Nach 30 Minuten dauernder Polymerisation bei Zimmertemperatur wurde der Parafilm entfernt, die Trennkammer mit E-Puffer mit einem Zusatz von 1% (w/v) Natriumlaurylsulfat (nicht umkristallisiert) gefüllt, eine Gleichstromquelle angeschlossen (+Pol oben, -Pol unten) und eine 30 Minuten dauernde Präelektrophorese mit einer Stromstärke von 3 mA pro Gel durchgeführt. Nach einem Wechsel des Puffers in der oberen Kammer wurden die Proben mit einem Volumen von 100 µl mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe aufgesetzt und wieder ein Gleichstrom von 3 mA pro Gel angelegt. Die Elektrophorese wurde so lange durchgeführt, bis das den Proben zugesetzte Phenolrot den unteren Rand der Gele erreicht hatte. Dies dauerte im allgemeinen 3 Stunden. Darauf wurden die Röhrchen aus der Trennkammer genommen, die Gele mit einer Mischung aus Glycerin und Wasser (āā) mit einer dünnen Nadel umspritzt und aus den Röhrchen gepreßt.

3.2.6.6.3. Die Färbung der Gele

Die Gele wurden in Reagenzgläser gebracht und diese mit einer 0,25 proz. (w/v) Lösung von Coomassie blue ²⁾ in Methanol-Eisessig-Wasser (5:1:4) aufgefüllt. Nach 60 Minuten wurde die Farblösung durch einen Entfärber (5% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Eisessig in Aqua dest.) ersetzt.

1)

Coomassie Brilliant blau R - 250 rein
Serva Entwicklungslabor, Heidelberg.

2)

Parafilm M, Laboratory Film
American Can Company, Neenah, Wisconsin, U.S.A.

Nach mehrmaligem Wechsel des Entfärbers waren die Gele meist nach 48 Stunden entfärbt. Die Proteinbanden waren tief blau gefärbt.

3.2.6.6.4. Molekulargewichtsbestimmungen

Zur Bestimmung der Molekulargewichte der Proteine des cytopathogenen Agens wurden Albumin (MG 67.000), Ovalbumin (MG 45.000), Chymotrypsinogen (MG 25.000) und Cytochrom C (MG 13.000) ¹⁾ in E-Puffer gelöst, in gleicher Weise wie das zu untersuchende Virusmaterial behandelt und mit diesem zusammen einer Elektrophorese unterworfen. Für jede Probe wurden 2 Gele eingesetzt, die alle gleich behandelt wurden. Die vom positiven zum negativen Pol zurückgelegten Strecken der Referenzproteine wurde ausgemessen, und diese Werte wurden gegen den Logarithmus des entsprechenden Molekulargewichts aufgetragen. Die von den viralen Proteinen zurückgelegten Strecken wurden ebenfalls ausgemessen und ihre Molekulargewichte mit Hilfe der aus den Referenzproteinen festgelegten Eichgeraden ermittelt.

3.2.6.7. Die Markierung mit ³H-Thymidin

Bei den Versuchen zum Einbau von ³H-Thymidin in das cytopathogene Agens wurden 5 dichtgewachsene Zellkulturen in Roux-Schalen dreimal mit thymidinfreiem TCM 199 ²⁾ abgewaschen und anschließend mit je 10 ml Saatvirus beimpft. Nach einer Adsorptionszeit von 2 Stunden bei +37° C wurde das Inokulum abgesaugt und der Zellrasen nochmals

1) Combithek Eichproteine, Größe 11
Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim.

2) Serva Entwicklungslabor, Heidelberg.

mit thymidinfreiem TCM 199 abgewaschen. Gleichzeitig mit der Zugabe von 50 ml Erhaltungsmedium (TCM 199, thymidinfrei) wurde das radioaktive Präparat ¹⁾ einpipettiert. Für jeden Milliliter der Zellkultur-Flüssigkeit wurden 10 µCi eingesetzt. Schädigender Einfluß der radioaktiven Strahlen wurde durch den Vergleich mit entsprechenden, nicht markierten Kontrollkulturen überwacht. Virusernte und Aufbewahrung sowie Reinigung und Konzentrierung erfolgten wie schon beschrieben.

3.2.6.8. Die Messung der Radioaktivität gereinigter und konzentrierter, ³H-markierter Viruspräparationen

Zur Messung der Radioaktivität gereinigter und konzentrierter, ³H-markierter Viruspräparationen wurden der jeweiligen Probe 10 µl entnommen und in ein Zählgläschen ²⁾ überführt, in das schon 1 ml Aqua bidest. vorgelegt war. Nach gründlichem Durchmischen wurde in jedes Zählgläschen 10 ml Szintillationsflüssigkeit "Insta-Gel" ³⁾ hinzugegeben und die Flüssigkeiten wiederum gut durchmischt. Danach wurde die Probe in einem Packard Tri Carb Liquid Scintillation Spectrometer (Model 3375) gemessen.

¹⁾ Thymidine-(methyl-³H) aqueous solution, sterilized, 5 Ci/mmol
The Radiochemical Centre Amersham, England.

²⁾ ISO Gesellschaft für Arzneiverpackung m.b.H.
Königshofen in Grabfeld.

³⁾ Insta-Gel^R, for Aqueous samples,
Packard Instrument G.m.b.H., Frankfurt am Main.

3.2.6.9. Die Messung "säureunlöslicher Radioaktivität" nach Fällung und Filtration von ^3H -DNA

Die Fällung der Nucleinsäure wurde in einem Eisbad durchgeführt. Der nucleinsäurehaltigen Probe wurden 10 μl entnommen und zu 0,3 ml einer bereits vorgelegten Hefe-RNA-Stammlösung (0,3 ml Hefe-RNA in SSC = 300 μg Hefe-RNA) ¹⁾. Nach Zugabe von 5 ml einer 5 proz. Trichloressigsäurelösung mit 0,1 M Na-Pyrophosphat wurde die Nucleinsäure präzipitiert (20 Minuten, +4° C) und das säureunlösliche Material anschließend auf Membranfiltern ²⁾, die vorher 20 Minuten lang in der 5 proz. Trichloressigsäurelösung + 0,1 M Na-Pyrophosphat eingeweicht worden waren, gesammelt. Jeder Filter wurde fünfmal mit 4 ml der eiskalten 5 proz. Trichloressigsäure, die 0,1 M Na-Pyrophosphat enthielt, nachgewaschen, 10 Minuten lang mit einer Infrarotlampe getrocknet und in ein Szintillationsgläschen verbracht, in das bereits 10 ml Toluol-PP0 ³⁾ vorgelegt worden war. Jede Probe wurde in der oben beschriebenen Weise im Szintillationszähler gemessen.

3.2.6.10. Bestimmung der Dichte infektiöser Viruspartikeln

Zur Bestimmung der Dichte infektiöser Viruspartikeln wurde ein Gemisch aus "heißem" und "kaltem" Virusmaterial in der beschriebenen Weise gereinigt und konzentriert. Am Ende der isopyknischen Zentrifugierung wurde der Inhalt des Zellulosebechers nach Punktion des Becherbodens mit einer

1)
Ribonucleinsäure reinst
Schuchardt, München

2)
Sartorius Membranfilter, $\varnothing$ 25 mm, Porengröße 0,6 μ .

3)
1.000 ml Toluol (p.a. Fa. E. Merck AG, Darmstadt)
+ 5 g PPO (2,5 Diphenyloxazol; Scintillation Grade;
Packard Instrument G.m.b.H., Frankfurt am Main).

Kanüle in 10 Fraktionen abgenommen, die Dichte der Fraktionen mit einem Refraktometer und einer Eichkurve, ihre Radioaktivität und ihre Infektiosität ermittelt und solche Fraktionen, denen im Streulicht sichtbare Banden zugeordnet wurden, elektronenmikroskopisch untersucht.

3.2.6.11. Die Isolierung ^3H -markierter DNA und die Bestimmung ihrer Dichte

Zur Isolierung ^3H -markierter DNA aus gereinigtem und konzentriertem Virusmaterial wurde ein von ZUR HAUSEN und SOKOL (1969) zur Isolierung zellulärer DNA beschriebenes Verfahren angewandt.

Bei der Durchführung der Prozedur ist es erforderlich, die Probe - wenn nicht anders angegeben - in einem Temperaturbereich zwischen 0°C und $+4^\circ\text{C}$ zu halten und starkes Schütteln oder Pipettieren zu vermeiden.

Das ^3H -markierte Virusmaterial wurde über Nacht gegen einen Puffer, der 0,05 M Tris-HCl, pH 7,8, und 0,01 M EDTA enthielt, dialysiert. Zwanzig Minuten nach Lysis der Probe durch einen Zusatz von 1% (w/v) Natriumlaurylsulfat wurde Pronase P ¹⁾, die 10 Minuten lang auf $+80^\circ\text{C}$ erwärmt worden war, in einer Endkonzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ zugefügt und die Mischung 30 Minuten lang in einem Wasserbad von $+37^\circ\text{C}$ bebrütet. Nach Abkühlung in Eiswasser wurde die Probe über Nacht gegen SSC dialysiert und dann in einer Lösung von CsCl in SSC aufgenommen. Die Dichte der Probe wurde durch Zugabe von CsCl auf 1,71 g/ml eingestellt. Nach einer 60 Stunden dauernden Zentrifugierung bei 38.000 U./Min und einer Temperatur von $+16^\circ\text{C}$ in einem Rotor SW 65

1)

Pronase P, lyophil. elektrophoret. rein,
Protease aus *Streptomyces griseus*, pH-Optimum 7 - 8
Serva Entwicklungslabor, Heidelberg.

(p_i $14,4 \times 10^8$) in einer Ultrazentrifuge Model Spinco L50 wurde der Inhalt des Bechers durch Punktion des Becherbodens in 19 Fraktionen abgenommen. Zur Bestimmung der Dichte einzelner Fraktionen wurde ihr Brechungsindex mit einem Refraktometer bei Zimmertemperatur (ca $+23^\circ \text{C}$) ermittelt und ihre Dichte mit der von IFFT et al. (1961) angegebenen Gleichung

$$D^{25.0^\circ \text{C}} = 10.8601 n_D^{25.0^\circ \text{C}} - 13.4974$$

berechnet. Die Messung der Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde in der beschriebenen Weise mit einem flüssigen Szintillator durchgeführt.

3.2.6.12. Die enzymatische Verdauung isolierter, ^3H -markierter viraler DNA

Zur Prüfung der Desoxyribonuclease-(DNase-)Empfindlichkeit isolierter ^3H -markierter viraler DNA wurde diese 18 Stunden lang gegen einen 0,01 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,2, mit 0,01 M CaCl_2 und 0,01 M MgCl_2 dialysiert. Ribonuclease-(RNase-)freie DNase ¹⁾ wurde im gleichen Puffer, RNase ²⁾ in einem 0,01 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,2, mit 0,01 M MgCl_2 in einer Konzentration von jeweils 500 $\mu\text{g/ml}$ gelöst. Die RNase-Lösung wie auch der Puffer, gegen den die DNA-Präparation dialysiert wurde, waren unmittelbar vor Gebrauch 10 Minuten lang auf $+80^\circ \text{C}$ erhitzt worden. Zu jeweils $2 \times 100 \mu\text{l}$ des DNA-Präparates wurden 10 μl der DNase- beziehungsweise

1) Deoxyribonuclease I (DNase I)
from bovine pancreas, Grade I
Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim.

2) Ribonuclease A
from bovine pancreas
Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim.

Lösungen einpipettiert. Die RNase enthaltenden Proben enthielten zusätzlich je 10 µl einer 10 Minuten auf +80° C erhitzten Lösung von 2 M NaCl in Aqua bidest. Nach vorsichtigem Durchmischen der Proben wurden diese 30 Minuten lang in einem Wasserbad bei +37° C bebrütet und dann ihre "säureunlösliche Radioaktivität" in der beschriebenen Weise bestimmt.

3.2.6.13. Die Berechnung des Guanin+Cytosingehaltes viraler DNA aus ihrer Dichte in Cäsiumchlorid

Die Dichte einer DNA in einer CsCl-Lösung ist direkt proportional zu ihrem Gehalt an Guanin+Cytosin (SUOEKA et al., et al., 1959; ROLFE und MEELSON, 1959; SCHILDKRAUT et al., 1962). Aus der von SCHILDKRAUT et al. (1962) angegebenen Gleichung

$$\rho = 0,098 (GC) + 1,660 \text{ g cm}^{-3}$$

wurde der Guanin+Cytosingehalt isolierter viraler DNA berechnet.

3.2.6.14. Die Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten $S_{20,W}$ infektiöser Partikeln

Für die Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten $S_{20,W}$ wurde die Methode von MC EWEN (1967) in der von STROHMAIER (1972) angegebenen Weise angewandt.

In Becher des Rotors SW 41 wurden 5 bis 35% (w/v) Lösungen von Saccharose in TEN-Puffer, pH 7,5, in Stufen von jeweils 5% eingeschichtet und über Nacht bei +4° C gehalten. In dieser Zeit bildete sich ein linearer Gradient. Dies wurde nach Abnahme eines Gradienten in Fraktionen mit einem Refraktometer überprüft. Als Fixpunkte wurden die Abstände der 10%- und der 30%-Konzentrationen ermittelt. Hierbei wurde davon ausgegangen, daß der Boden im Becher eines Rotors SW 41 15,2 cm von der Drehachse des Rotors entfernt ist. Zwei Stunden vor Beginn des Versuches wurde der Gradient bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Dann wurde eine gereinigte und konzentrierte, im Streulicht deutlich sichtbare Viruspräparation in TEN-Puffer pH 7,5, mit einem Volumen von 0,8 ml auf den Gradienten geschichtet und der Abstand des Meniskus von der Rotorachse bestimmt. In einer Ultrazentrifuge Model Spinco L2 mit guter Regelung von Temperatur und Umdrehungszahl wurde die Probe 90 Minuten lang bei 10.000 U./Min und einer Temperatur von +20° C in einem Rotor SW 41 (12.052 x g) zentrifugiert. Die Anlaufzeit bis zum Erreichen der Höchstdrehzahl, die Zeit bei konstanter Drehzahl und die Zeit bis zum Stillstand des Rotors sowie die in diesen Zeiten erfolgten Umdrehungen wurden notiert. Am Ende der Zentrifugierung wurde der Abstand der im Streulicht deutlich sichtbaren Virusbande von der Rotorachse gemessen, die Bande nach Punktion des Becherbodens mit einer Kanüle abgenommen und die Saccharosekonzentration dieser Fraktion mit einem Refraktometer ermittelt. Aus den ermittelten Werten wurde der Sedimentationskoeffizient $S_{20,w}$ infektiöser Partikeln mit Hilfe der Tabellen von MC EWEN (1967) in der von STROHMAIER (1972) angegebenen Weise errechnet.

3.2.6.15. Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden freundlicherweise von Herrn Privatdozent Dr. S. Ueberschär durchgeführt ¹⁾.

3.2.7. Infektionsversuche mit Schafen und kleinen Versuchstieren

Zur Prüfung der Pathogenität des cytopathogenen Agens für Schafe wurde ein ungefähr 40 kg schweres Merinoschaf mit 5 ml einer Virussuspension ($\log_{10} \text{KID}_{50}$ 4,7/0,1 ml) intramuskulär infiziert. Zur Kontrolle einer möglichen Übertragung wurde es mit einem nicht infizierten Schaf gemeinsam aufgestellt. In den Seren beider Tiere waren zu Versuchsbeginn weder neutralisierende Antikörper gegen das cytopathogene Agens noch präzipitierende Antikörper gegen das zur Infektion benutzte Isolat oder ein Mischantigen aus humanen Adenoviren nachweisbar. Über einen Zeitraum von 2 Wochen wurden beide Tiere täglich beobachtet sowie Blut- und Kotproben genommen. Dann wurde auch das Kontrolltier auf die gleiche Weise infiziert und wiederum 2 Wochen lang beobachtet.

1)

Siemens Elmiskop 101,
Wernerwerk für Messtechnik, Karlsruhe.

Eine Übersicht über die zur Prüfung der Pathogenität herangezogenen kleinen Versuchstiere aus institutseigener Zucht gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Zur Prüfung der Pathogenität des cytopathogenen Agens eingesetzte kleine Versuchstiere (Tierart, Tierzahl, Infektionsmodus und Impfdosis).

Tierart	Zahl	Infektionsart	Impfdosis (ml) ¹⁾
Maus (erwachsen)	10	i.m.	0,5
	10	s.c.	0,5
Maus (abgesetzt)	10	i.m.	0,5
	10	s.c.	0,5
Maus (3 Tage alt)	10	s.c.	0,2
	10	i.c.	0,05
Hamster (Baby-)	8	s.c.	0,2
Kaninchen	2	i.m.	1,5
Meerschweinchen	5	s.c.	0,5

¹⁾ Zellkultur-Virus, $\log_{10}$ KID₅₀ 4,7/0,1 ml

3.3. Ergebnisse

3.3.1. Die Vermehrung des cytopathogenen Agens

Bei der Isolierung des cytopathogenen Agens war eine Suspension von Schafkot auf einschichtige Zellkulturen aus Schafnieren-Epithelien gebracht worden, in denen dann die Entstehung eines CPE und das Auftreten von Einschußkörpern zu beobachten war; diese Erscheinungen waren mit dem Überstand so veränderter Zellkulturen auf andere Zellkulturen gleicher Art übertragbar (BAUER, 1972). Da frische Schafnieren zur Herstellung von Zellkulturen nur schwierig zu beschaffen waren, wurde versucht, mit solchem Zellkultur-Überstand das cytopathogene Agens auch in BHK 21-MDCK 65- und PK 15-Zell-Linien, in primären und sekundären Kälbernieren-Zellkulturen, Kälberhoden-Zellkulturen und Zellkulturen aus Hühnerembryofibroblasten zu vermehren. In keinem Falle jedoch wies ein CPE oder die Bildung von Einschußkörpern - auch nach mehreren Blindpassagen - auf eine Vermehrung des cytopathogenen Agens hin.

In Schafnieren-Zellkulturen war nach einigen Passagen von infektiösem Zellkultur-Überstand das raschere Auftreten cytopathischer Veränderungen, die schnellere totale Zerstörung der Kulturen und eine Steigerung der Infektiosität festzustellen (Tabelle 2). Das Vermehrungsverhalten des cytopathogenen Agens in der Zellkultur - bestimmt durch die Ermittlung der Infektiosität von Zellen und Zellkultur-Überstand - ist in Abbildung 1 dargestellt. Hieraus wird ersichtlich, daß bei einer Infektion mit ungefähr 2 infektiösen Einheiten pro Zelle nach einer Eklipse von weniger als 24 Stunden eine starke Vermehrung des infektiösen Prinzips erfolgte, und daß der weitest- aus größte Teil der Infektiosität zellgebunden blieb.

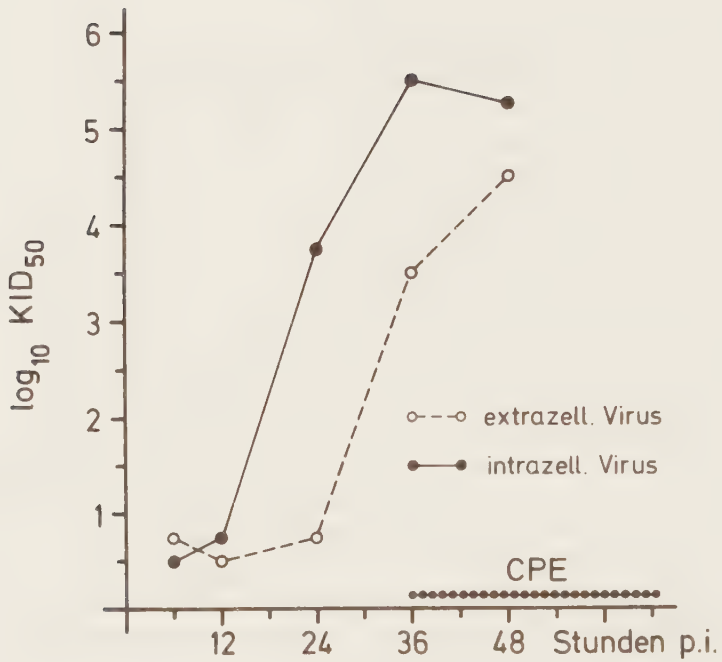


Abbildung 1 : Das Vermehrungsverhalten des cytopathogenen Agens in der Zellkultur. Dargestellt sind die zellgebundene Infektiosität, die Infektiosität des Zellkultur-Überstandes zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion mit ca 2 infektiösen Einheiten pro Zelle sowie der Beginn des CPE. Die Angaben der Infektiosität beziehen sich auf 0,1 ml.

Tabelle 2 : Änderung des Verhaltens des cytopathogenen Agens in der Zellkultur mit steigender Zahl der Passagen.

Zahl der Zellkultur-Passagen	Erstes Auftreten des CPE ¹⁾	Totale Zerstörung der Kultur ¹⁾	Titer ²⁾
3	84 - 92	120 - 148	3,5
7	72 - 84	108 - 120	4,7
18	36 - 42	60 - 72	5,5

¹⁾ Stunden nach der Infektion

²⁾ $\log_{10}$ KID₅₀/0,1 ml

3.3.2. Entwicklung und Morphologie des CPE

Bei lichtmikroskopischer Betrachtung infizierter nativer Zellkulturen war gegenüber nicht infizierten Kontrollkulturen zuerst eine herdförmige Veränderung einzelner Zellen zu erkennen. Diese Zellen vergrößerten sich, rundeten sich ab, wurden lichtdurchlässiger, verstärkten die Konturen ihrer Zellwand und lösten sich aus dem Zellverband. Meist lagen mehrere dieser herausgelösten Zellen in dichten, nun dunkel erscheinenden traubenartigen Haufen auf dem Zellrasen zusammengeballt. Bei längerer Züchtung breiteten sich diese Veränderungen über die ganze Kultur aus, Zellhaufen wurden abgeschwemmt, im Zellrasen entstanden unregelmäßig geformte Löcher, bis nur noch vereinzelt an der Glaswand haftende Zellen nach der totalen Zerstörung der Kultur übrigblieben.

3.3.3. Entstehung und Aussehen von Einschußkörpern

3.3.3.1. Lichtmikroskopische Untersuchung

Bereits 12 Stunden nach der Infektion erschienen in Zellkulturen, die mit Bouin'scher oder Carnoy'scher Lösung fixiert und in der angegebenen Weise mit Phloxin-Tartrazin gefärbt worden waren, bei Betrachtung mit dem Lichtmikroskop die Kerne einzelner Zellen gegenüber denen nicht infizierter Kontrollen vergrößert. In den Zellkernen waren einzelne kleine azidophile Granula zu erkennen, die unregelmäßig verteilt oder in Schollen zusammengelagert waren. Nach weiteren 12 Stunden war die Zahl der veränderten Kerne vermehrt, die azidophilen Granula hatten sich vergrößert, bildeten nun ein feines Netzwerk oder hatten sich locker zusammengelagert. Wiederum 12 Stunden später hatten sich dichte, zentral im Nucleus gelegene basophile Massen mit unregelmäßigen Umrissen gebildet, die gegen die jetzt meist hyperchromatische Kernwand durch einen hellen Hof abgesetzt, gelegentlich auch durch feine Fäden mit dieser verbunden waren. Zu diesem Zeitpunkt nahm der stark vergrößerte Zellkern den größten Teil der Zelle ein, so daß nur noch ein schmaler cytoplasmatischer Rand zu erkennen war. In Zellkulturen mit stärker fortgeschrittenem CPE waren keine weiteren Veränderungen an den Zellkernen feststellbar.

Viele dieser intranucleären Einschußkörper waren in verschiedenen Entwicklungsstadien neben unveränderten Zellen mit dem Lichtmikroskop in Semidünnschnitten infizierter Gewebekulturen zu erkennen, die 36 Stunden p.i. hergestellt worden waren.

3.3.3.2. Elektronenmikroskopische Untersuchung

Auf der elektronenoptischen Darstellung eines Ultradünnschnittes durch eine infizierte Zelle (Abbildung 2) sind

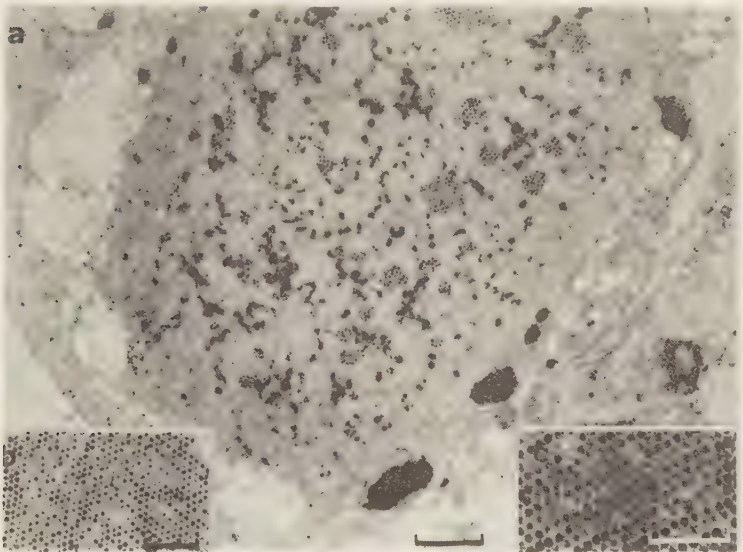


Abbildung 2 : Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultradünnschnittes durch eine infizierte Zelle 36 Stunden p.i.

- a. Vergrößerung 12000 fach; 12 mm entsprechen 1000 nm
- b. Vergrößerung 18000 fach; 9 mm entsprechen 500 nm
- c. Vergrößerung 36000 fach; 15 mm entsprechen 500 nm

36 Stunden p.i. zahlreiche Viruspartikeln zu erkennen, die einzeln oder in kleinen Gruppen, meist aber in großer Zahl in dichter kristallartiger Anordnung in der Mitte des Zellkernes liegen. Oft finden sich unmittelbar neben diesen Anhäufungen von Viruspartikeln unregelmäßig geformte dunkle Gebilde, die sich aus unterschiedlich dicht gelagerten Granula zusammensetzen. Am Rande der unverändert erscheinenden Kernwand finden sich mehrere, annähernd längs-oval geformte Flecken unterschiedlicher Größe, die ebenfalls eine granuläre Struktur aufweisen, wobei hier die Granula sehr dicht beieinander liegen.

3.3.4. Die Prüfung der Chloroformstabilität

Das Ergebnis einer Behandlung des cytopathogenen Agens mit Chloroform ist in Tabelle 3 wiedergegeben. Da diese Behandlung keinen Verlust von Infektiosität verursachte, ist das Isolat chloroformstabil. Somit sind an seinem Aufbau essentielle Lipide nicht beteiligt.

Tabelle 3 : Einfluß von Chloroform auf die Infektiosität des cytopathogenen Agens.

	mit Chloroform behandelte Probe	Kontrolle
Titer ¹⁾	4,7	4,7

¹⁾ $\log_{10}$ KID₅₀/0,1 ml

3.3.5. Die Prüfung der pH-Stabilität

Infektiöser Zellkultur-Überstand, dessen pH-Wert auf 3,0 eingestellt worden war, zeigte nach einer 3 Stunden dauernden Lagerung bei +4° C nur einen geringen Verlust an Infektiosität, so daß das Isolat als säurestabil zu erachten ist. Bei einem in gleicher Weise untersuchten Virus der Maul- und Klauenseuche (MKS-V) war keine Infektiosität mehr nachzuweisen (Tabelle 4).

Tabelle 4 : Einfluß eines pH-Wertes von 3,0 auf die Infektiosität des cytopathogenen Agens und eines Virus der Maul- und Klauenseuche.

	cytopathogenes Agens		MKS-V (A ₂ Spanien)	
	pH 3,0	pH 7,2	pH 3,0	pH 7,2
Titer ¹⁾	4,5	4,7	0	6,7

¹⁾ log₁₀ KID₅₀/0,1 ml

3.3.6. Die Thermostabilität des cytopathogenen Agens und der Einfluß von Ionen auf die Thermoaktivierung

Die 30 Minuten dauernde Einwirkung von +60° C auf eine Suspension des cytopathogenen Agens in Zellkultur-Überstand war mit einem vollständigen Verlust der Infektiosität verbunden. Jedoch war infektiöser Zellkultur-Überstand mehrere Tage bei +4° C aufzubewahren, ohne daß ein Titerabfall eingetreten wäre. Nach einem Zusatz von 2% (w/v) Lactalbuminhydrolysat zu infektiösem Zellkultur-Überstand war das Isolat ohne Infektiositätsverlust lyophilisierbar.

Der Einfluß mono- und bivalenter Ionen auf die Thermo-inaktivierung von infektiösem Zellkultur-Überstand bei +50° C ist in Tabelle 5 wiedergegeben. Aus diesem Versuch ergibt sich, daß Na⁺-Ionen gegenüber einer Kontrolle mit Aqua bidest. eine gewisse Stabilisierung der Infektiosität bedingen, während Mg⁺⁺-Ionen einen signifikanten Verlust an Infektiosität verursachen.

Tabelle 5 : Wirkung von Kationen auf die Stabilität des cytopathogenen Agens bei einer 60 Minuten dauernden Erwärmung auf +50° C.

	Kontrolle	Aqua bidest.	1M Mg ⁺⁺	1M Na ⁺
Titer ¹⁾	4,5	4,3	2,1	4,5

¹⁾ log₁₀ KID₅₀/0,1 ml

3.3.7. Reinigung und Konzentrierung

3.3.7.1. Die Fällung mit Polyäthylenglykol 6000

Durch die Fällung von infektiösem Zellkultur-Überstand mit PEG 6000 wurde eine Volumenverminderung und durch die nachfolgende Elution des Präzipitates eine Reinigung der Virussuspension erzielt. Die Bilanz eines solchen Versuches ist in Tabelle 6 aufgestellt. Hierfür wurde die durch Titration ermittelte Infektiosität der einzelnen Virussuspensionen in "infektiöse Einheiten" (IE/ml, IE/Vol. und IE %) umgerechnet und diese den entsprechenden Proteinwerten ¹⁾ (Prot. mg %, Prot./Vol. und Prot. %) gegenübergestellt. Aufschluß über die erzielte Reinigungswirkung gibt die Beziehung von 1 mg Protein zu der jeweils darauf

¹⁾ Die Bestimmung des Proteingehaltes von Virussuspensionen nach LOWRY et al. (1951) hatte dankenswerterweise Herr Dr. H.D. Matheka übernommen.

entfallenden Infektiosität (mg : IE). Die Daten der Übersichten über die Sedimentation durch Ultrazentrifugierung und über die Reinigung mit Arcton 113 sind in derselben Weise angeordnet.

Tabelle 6 : Konzentrierung und Reinigung von infektiösem Zellkultur-Überstand durch Fällung mit PEG 6000.

	Volumen (ml)	1000
	IE/ml	$3,1 \times 10^6$
	IE/Vol.	$3,1 \times 10^9$
	Prot. mg%	56,2
	Prot./Vol.(mg)	562,0
Ausgangsmaterial	Prot. : IE	$1 : 5,3 \times 10^6$
	Volumen (ml)	1200
	IE/ml	$5,0 \times 10^5$
	IE/Vol.	$6,0 \times 10^8$
	Prot. mg%	22,8
	Prot./Vol.(mg)	273,0
Überstand nach der Fällung	Prot. : IE	$1 : 2,2 \times 10^6$
	Volumen (ml)	20,0
	IE/ml	$1,2 \times 10^8$
	IE/Vol.	$2,4 \times 10^9$
	Prot. mg%	418,0
	Prot./Vol.(mg)	83,6
Ausbeute	IE %	77,0
	Prot. %	14,8
	Prot. : IE	$1 : 2,7 \times 10^7$

3.3.7.2. Die Konzentrierung durch Ultrazentrifugierung in einem Festwinkelrotor

Durch die Sedimentation in einem Rotor 19 mit nachfolgender Elution in ein hundertfach kleineres Volumen konnte das cytopathogene Agens in kurzer Zeit nahezu quantitativ konzentriert und gleichzeitig gut gereinigt werden. Das Ergebnis eines solchen Versuches ist in Tabelle 7 dargestellt.

3.3.7.3. Die Reinigung mit Arcton 113

Die Reinigung von konzentriertem infektiösem Zellkultur-Überstand sowie von gefrorenem und wieder aufgetautem infektiösem Zellmaterial mit Arcton 113 erwies sich als sehr schonend und wirkungsvoll, wobei jedoch der Reinigungseffekt nicht so stark wie der in der Literatur genannte - z.B. PHILIPSON (1967) - war. Das Ausgangsmaterial für eine in Tabelle 8 aufgestellte Bilanz der Reinigung einer Virus-suspension mit Arcton 113 bestand aus Eluaten von Virusmaterial nach der Sedimentation von infektiösem Zellkultur-Überstand in einem Rotor 19.

3.3.7.4. Die Konzentrierung durch Ultrazentrifugierung in CsCl-Gradienten

Virusmaterial, das durch Fällung mit PEG 6000 oder durch Sedimentation in einem Rotor 19 aus infektiösem Zellkultur-Überstand gewonnen worden war, wurde mit den aus Zellmaterial erhaltenen Virussuspensionen gemischt und durch Ultrazentrifugierung in einem zweistufigen CsCl-Gradienten, gefolgt von einer isopyknischen Zentrifugierung in einer CsCl-Lösung weiter konzentriert und gereinigt.

Tabelle 7 : Ultrazentrifugierung von infektiösem Zellkultur-Überstand in einem Rotor 19 (60 Minuten, 12.000 U./Min, 35.800 x g).

	Volumen (ml)	480
	IE/ml	$3,1 \times 10^6$
	IE/Vol.	$1,4 \times 10^9$
	Prot. mg%	56,2
	Prot./Vol.(mg)	269,7
Ausgangsmaterial	Prot. : IE	$1 : 5,4 \times 10^6$
	Volumen (ml)	480
	IE/ml	$3,1 \times 10^4$
	IE/Vol.	$1,4 \times 10^7$
	Prot. mg%	48,2
	Prot./Vol.(mg)	231,3
Überstand nach Zentrifugierung	Prot. : IE	$1 : 6,0 \times 10^4$
	Volumen (ml)	4,8
	IE/ml	$2,9 \times 10^8$
	IE/Vol.	$1,3 \times 10^9$
	Prot. mg%	421,3
	Prot./Vol.(mg)	20,2
Ausbeute	IE %	93
	Prot. %	7,9
	Prot. : IE	$1 : 6,4 \times 10^7$

Tabelle 8 : Arcton 113-Reinigung eines Eluates nach Zentrifugierung von infektiösem Zellkultur-Überstand in einem Rotor 19.

	Volumen (ml)	4,8
	IE/ml	$2,9 \times 10^8$
	IE/Vol.	$1,3 \times 10^9$
	Prot. mg%	421,3
	Prot./Vol.(mg)	20,2
Ausgangsmaterial	Prot. : IE	$1 : 6,4 \times 10^7$
	Volumen (ml)	4,2
	IE/ml	$2,9 \times 10^8$
	IE/Vol.	$1,2 \times 10^9$
	Prot. mg%	285,1
	Prot./Vol.(mg)	11,9
Ausbeute	IE %	93,3
	Prot. %	58,9
	Prot. : IE	$1 : 1,0 \times 10^8$

Nachdem Vorversuche gezeigt hatten, daß infektiöses Material bei der Verwendung von dreistufigen CsCl-Gradienten der Dichten 1,20 g/ml, 1,30 g/ml und 1,40 g/ml in einen Dichtebereich größer als 1,30 g/ml sedimentierte, wurde auf die Stufe der Dichte 1,20 g/ml verzichtet und es wurden nur zweistufige Gradienten eingesetzt. In diesen waren am Ende eines Laufes drei, im Streulicht bläulich opalisierende, scharfe Banden deutlich zu erkennen. Von diesen hatte sich eine schneller sedimentierende Bande von den sehr dicht beieinander liegenden anderen abgesetzt. Wurden diese 3 Banden gesammelt, ge-

mischt und anschließend mit diesem Material eine Gleichgewichtszentrifugierung durchgeführt, so trat diese Verteilung wieder auf. Während die Bande mit der größten Dichte deutlich abgesetzt und gut zu isolieren war, gelang die Trennung der beiden anderen nicht. Die Verteilung der Infektiosität in einem Gradienten, der am Ende eines Gleichgewichtslaufes - durchgeführt mit radioaktiv markiertem und nicht markiertem Virusmaterial - in Fraktionen abgenommen wurde, ist in Abbildung 3 dargestellt. Die Fraktion, welche die größte Infektiosität aufwies, enthielt die deutlich abgesetzte, gut isolierbare Einzelbande, in welcher bei elektronenmikroskopischer Untersuchung nur komplette Viruspartikeln und einzelne ihrer Untereinheiten, jedoch keine anderen Strukturen zu erkennen waren.

3.3.8. Die Bestimmung der Dichte infektiöser Partikeln

Am Ende einer zur Reinigung und Konzentrierung des cytopathogenen Agens durchgeführten Gleichgewichtszentrifugierung hatte sich ein annähernd linearer Dichtegradient ausgebildet. Ein Profil der Dichte durch einen solchen Gradienten, der in Fraktionen abgenommen wurde wie auch die in ihnen enthaltene Infektiosität und Radioaktivität sind in Abbildung 3 dargestellt. Das Maximum von Infektiosität und Radioaktivität bandete in einem Dichtebereich von 1,34 g/ml. Mit dem Elektronenmikroskop waren in dieser Fraktion zahlreiche, komplette, einzeln liegende Viruspartikeln ohne Verunreinigungen zu erkennen. Die beiden anderen dicht zusammenliegenden Banden waren in einer Fraktion mit der Dichte 1,29 g/ml enthalten. Bei elektronenmikroskopischer Untersuchung dieser Fraktion waren nach Negativ-Kontrastierung mit Phosphorwolframsäure zahlreiche Viruspartikeln zu erkennen, in deren Inneres Phosphorwolframsäure diffundiert war und die dadurch hohl erschienen.

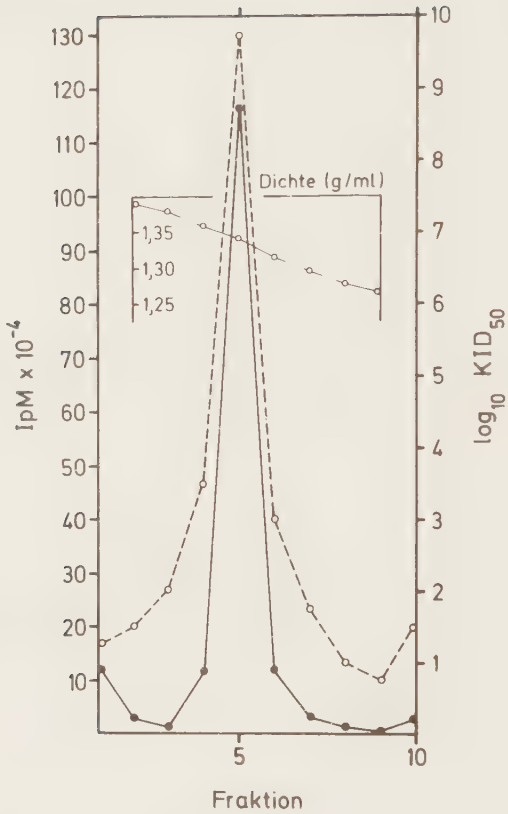


Abbildung 3 : Infektiositäts- und Radioaktivitätsverteilung eines Gemisches aus markiertem und nicht markiertem Virusmaterial nach Gleichgewichtszentrifugierung (SW 39L, 36.000 U./Min, 20 Stunden).

Unterbrochene Linie: Infektiosität, bezogen auf 0,1 ml

Durchgehende Linie, schwarze Punkte: Radioaktivität

Durchgehende Linie, weiße Punkte: Dichte

Neben diesen Partikeln waren in dieser Fraktion noch zahlreiche verschieden große Untereinheiten zerfallener Viruspartikeln vorhanden.

3.3.9. Der Sedimentationskoeffizient $S_{20,w}$ infektiöser Viruspartikeln

Aus den durch Zentrifugierung von gereinigtem und konzentriertem Virusmaterial in einem linearen Saccharosegradienten bei $+20^{\circ}\text{C}$ ermittelten Werten wurde der Sedimentationskoeffizient $S_{20,w}$ in der von STROHMAIER (1972) angegebenen Weise mit Hilfe der Tabellen von MC EWEN (1967) berechnet. Da diese Tabellen auf Dichten von 1,30 g/ml und 1,40 g/ml ausgelegt sind, für infektiöse Partikeln jedoch eine Flotationsdichte von 1,34 g/ml ermittelt worden war, erfolgte eine Interpolation der in den Tabellen angegebenen Werte auf eine Dichte von 1,35 g/ml. Der so ermittelte Sedimentationskoeffizient infektiöser Partikeln in Wasser bei $+20^{\circ}\text{C}$ $S_{20,w}$ beträgt 775 Svedberg. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung des in einer einheitlichen Bande sedimentierenden Virusmaterials wurde eine Aggregation von Viruspartikeln oder deren Zerfall nicht festgestellt.

3.3.10. Der Nucleinsäuretyp des cytopathogenen Agens

3.3.10.1. Die Färbung infizierter Zellkulturen mit Fluorochromen

In den Zellkernen von Deckglaskulturen, die mit dem cytopathogenen Agens infiziert und 36 bis 40 Stunden nach der Infektion mit Acridinorange oder Coriphosphin gefärbt worden waren, konnten bei Betrachtung mit dem Fluoreszenz-

mikroskop in zahlreichen Zellkernen leuchtend grüne Einschlußkörper erkannt werden, während unveränderte Zellkerne nur schwach grün und das Cytoplasma sowie einzelne Kernkörperchen matt ziegelrot erschienen. Dies weist auf einen hohen Gehalt an DNA in den veränderten Zellkernen hin, da diese in Verbindung mit Fluorochromen nach Erregung mit ultravioletttem Licht leuchtend grün, RNA jedoch ziegelrot erscheint.

3.3.10.2. Die Hemmung der Virusvermehrung durch 5-Jod-2'desoxyuridin

Durch einen Zusatz von 10^{-4} M JdUrd wurde die Vermehrung des cytopathogenen Agens in der Zellkultur signifikant gehemmt. Diese Wirkung war durch einen Überschuß von Thymidin aufzuheben. Hieraus kann geschlossen werden, daß eine DNA als Nucleinsäure vorliegt. Auf die Vermehrung eines Virus der Maul- und Klauenseuche als einem Vertreter RNA-haltiger Viren war JdUrd in gleicher Konzentration ohne Einfluß. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Tabelle 9 zusammengefaßt.

3.3.10.3. Der Einbau von ^3H -Thymidin

Den Einbau von ^3H -Thymidin in infektiöse Viruspartikeln zeigt Abbildung 3. Da in gereinigtem und konzentriertem Virusmaterial das Maximum der Infektiosität und das Maximum der Radioaktivität in der gleichen Gradientenfraction enthalten sind und diese bei Verwendung von "heißem" und "kaltem" Material die gleiche Dichte aufwies, kann daraus geschlossen werden, daß bei der Vermehrung des cytopathogenen Agens ^3H -Thymidin in die Nucleinsäure infektiöser Partikeln eingebaut wurde und somit eine DNA als Nucleinsäure vorliegt.

Tabelle 9 : Einfluß von 10^{-4} M JdUrd auf die Vermehrung des cytopathogenen Agens und eines Virus der Maul- und Klauenseuche in der Zellkultur und die Aufhebung dieser Wirkung durch den Zusatz von 80 µg/ml Thymidin.

Behandlung	Cytopathogenes Agens	Titer ¹⁾ MKS-V (A ₂ Spanien)
unbehandelte Kontrolle	4,7	6,7
10^{-4} M JdUrd	0,9	6,7
10^{-4} M JdUrd + 80 µg/ml Thymi- din	4,7	6,7

¹⁾ $\log_{10}$ KID₅₀/0,1 ml

3.3.11. Die Extraktion der Virusnucleinsäure und die Bestimmung ihrer Dichte

Während einer im Anschluß an eine Natriumlaurylsulfat-Pro-nase P-Extraktion ³H-Thymidin-markierter Nucleinsäure durchgeführten isopyknischen Zentrifugierung der Virusnucleinsäure in CsCl hatte sich ein nahezu linearer Dichtegradient ausgebildet. Das Maximum der Radioaktivität war nach der Abnahme des Gradienten in Fraktionen in einer Fraktion enthalten, deren Dichte aus ihrem Brechungsindex mit der von IFFT et al. (1961) angegebenen Gleichung mit $\varphi = 1,711$ g/ml errechnet wurde. Die Dichte sowie die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen sind in Abbildung 4 angegeben.

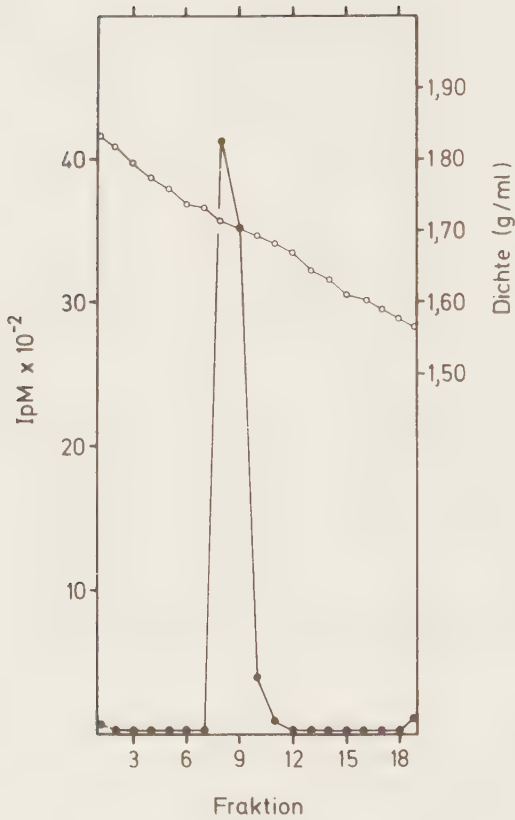


Abbildung 4 : Verteilung radioaktiver DNA des cytopathogenen Agens nach Gleichgewichtszentrifugierung (Rotor SW 65, 60 Stunden, 38.000 U./Min). Durchgehende Linie, schwarze Punkte: Radioaktivität
Durchgehende Linie, weiße Punkte: Dichte

3.3.12. Die enzymatische Verdauung isolierter DNA

Bei diesem Versuch wurde die Wirkung von DNase beziehungsweise von RNase auf isolierte ^3H -Thymidin-markierte Virusnucleinsäure geprüft. Als Kriterium der Wirksamkeit wurde die am Ende des Versuches noch vorhandene "säureunlösliche Radioaktivität" nach Fällung mit Trichloressigsäure ermittelt. Das Ergebnis ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10 : Wirkung von DNase beziehungsweise RNase auf isolierte ^3H -Thymidin-markierte virale Nucleinsäure. Angegeben ist die am Ende des Versuches noch vorhandene "säureunlösliche Radioaktivität".

Art der Probe	Impulse pro Minute	
	Probe Nr. I	Probe Nr. II
Nucleinsäure + DNase	288.4	245.6
Nucleinsäure + RNase ¹⁾	1528.8	1538.7
Nucleinsäure unbehandelt	1659.3	1626.8

¹⁾
+ 10 µl 2N NaCl

3.3.13. Der Guanin + Cytosin-Gehalt isolierter Virusnucleinsäure

Da nach isopyknischer Zentrifugierung isolierter ^3H -Thymidin-markierter DNA in CsCl das Maximum der

Radioaktivität in einer Fraktion der Dichte $\rho = 1,711 \text{ g/ml}$ enthalten war, wurde mit der von SCHILDKRAUT et al. (1962) angegebenen Gleichung ein Guanin + Cytosin-Gehalt von 52% errechnet.

3.3.13. Die Proteine des cytopathogenen Agens

Die Spaltung von gereinigtem und konzentriertem Virusmaterial mit 1% (w/v) Natriumlaurylsulfat und die Auftrennung der einzelnen Proteine mit 10 proz. Polyacrylamid-Gelel ergab nach Färbung mit Coomassie blue in mehreren Versuchen 9, in einem Versuch 10 deutliche Banden. Die Abbildung 5 zeigt ein mit Coomassie blue gefärbtes Gel und seine densitometrische Auswertung.

3.3.14. Ergebnisse elektronenmikroskopischer Untersuchungen

In gereinigten und konzentrierten Viruspräparationen waren nach Negativkontrastierung mit Phosphorwolframsäure hüllenlose, kubische Partikeln zu erkennen, deren deutliche Oberflächenstruktur eine Gliederung in Flächen gleichseitiger Dreiecke aufwies (Abbildung 6). Bei zahlreichen Partikeln waren die Achsen einer zweifachen (Abbildung 7a), einer dreifachen (Abbildung 7b) und - weniger deutlich - einer fünffachen Symmetrie zu erkennen. Auf jeder Seite jedes gleichseitigen Dreiecks waren 6 Capsomeren zu zählen, so daß sich aus der bei JAWETZ et al. (1968) angegebenen Gleichung $N = 10(n - 1)^2 + 2$, in welcher N die Gesamtzahl der Capsomeren und n die Zahl der Capsomeren auf einer Dreiecksseite bedeuten, eine Zahl von 252 Capsomeren ergibt. Die auf den Schnittpunkten der Dreiecksseiten liegenden Capsomeren waren von 5 Capsomeren, alle anderen von jeweils 6 Capsomeren umgeben (Abbildung 7a, b), so daß in

Anlehnung an die Bezeichnungen für Capsomeren von Adenoviren des Menschen nach VALENTINE und PEREIRA (1965) die mit nur 5 Nachbarn als Pentone, die mit 6 Nachbarn als Hexone bezeichnet wurden. Bei Partikeln, die in der Achse

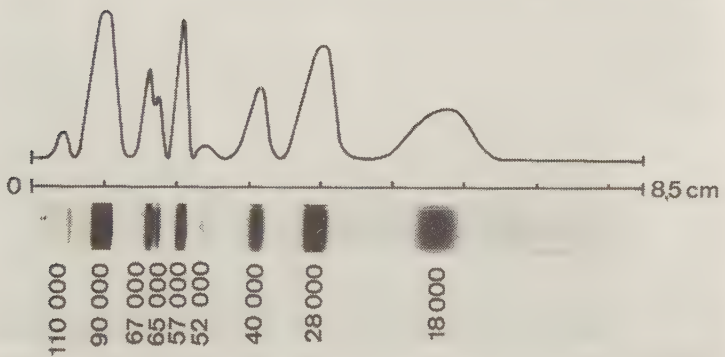


Abbildung 5 : Die Proteine des cytopathogenen Agens nach Spaltung mit Natriumlaurylsulfat und Trennung in einem Polyacrylamid-Gel. Dargestellt ist ein mit Coomassie blue gefärbtes Gel sowie seine densitometrische Auswertung mit einem Zeiss-Extinktionsschreiber Typ II. Die Wanderung der Proteine vom positiven zum negativen Pol erfolgte von links nach rechts. Die Zahlenangaben bedeuten die Molekulargewichte der einzelnen Proteine in Dalton.

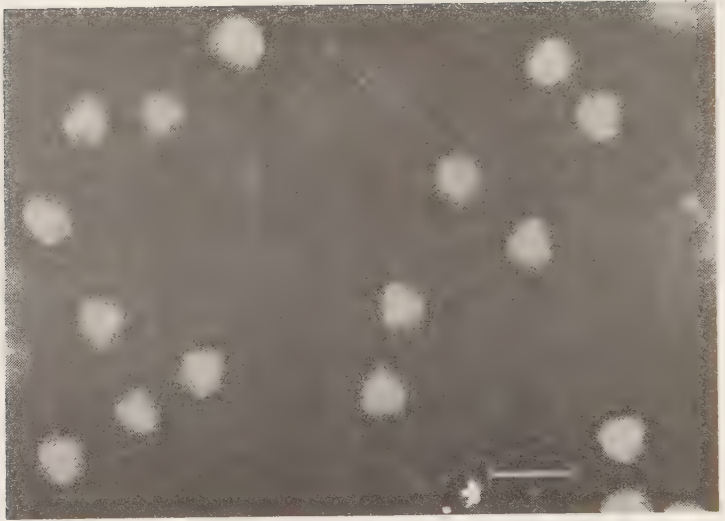


Abbildung 6 : Elektronenmikroskopische Aufnahme des durch wiederholte Ultrazentrifugierung in CsCl-Gradienten gereinigten und konzentrierten cytopathogenen Agens nach Negativkontrastierung mit Phosphorwolframsäure. Vergrößerung 120.000fach. 15 mm entsprechen 100 nm.

der dreifachen Symmetrie zu sehen waren, konnten gelegentlich radial vom Zentrum der Partikeln weggerichtete dünne Fortsätze mit endständigen knopfartigen Verdickungen erkannt werden (Abbildung 7c). Aus der Abbildung 8g wird ersichtlich, daß diese Fortsätze ihren Anfang an

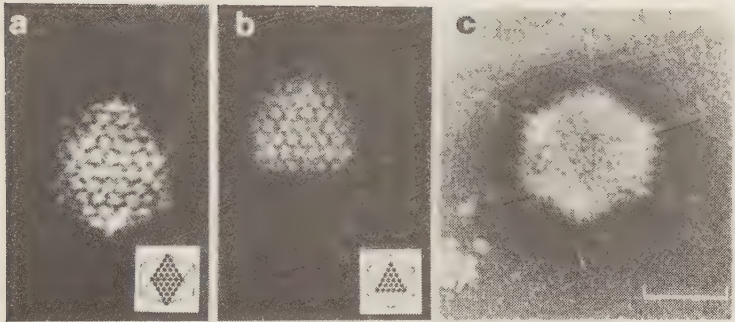


Abbildung 7 : Das cytopathogene Agens mit der Darstellung der Achsen der zweifachen (a) und der dreifachen (b) Symmetrie, der Hexone und der Pentone sowie der radial vom Zentrum eines Partikels weggerichteten Fibern (c). Vergrößerung 320.000fach. 15 mm entsprechen 50 nm.

Pentonen nehmen und somit ein 5 Dreiecken gemeinsames Capsomer markieren. Wiederum in Anlehnung an VALENTINE und PEREIRA (1965) wurden diese Fortsätze Fibern genannt.

Einzelne liegende oder in Gruppen angeordnete Hexone erwiesen sich als polygonale Hohlzylinder (Abbildungen 7a, b und 8b, c), während diese Struktur bei Pentonen nicht zu erkennen war (Abbildung 8h). Die häufig gefundenen Gruppen von 9 Hexonen (Abbildung 8b, c) lassen auf eine gewisse Regelmäßigkeit des Zerfalls von Viruspartikeln schließen (Abbildung 8a).

Die mit Hilfe eines Eichgitters ermittelten Größen der Viruspartikeln und ihrer Bausteine sind in Abbildung 8a angegeben. Der aus 50 Messungen errechnete Mittelwert des Durchmessers eines Viruspartikels ohne Fibern war 90,4 nm.

a

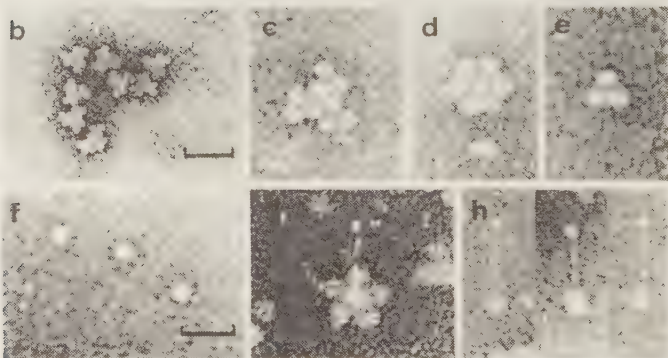
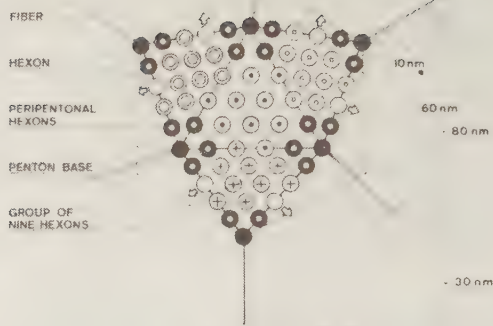


Abbildung 8 : a. Schematische Darstellung des Aufbaus eines Viruspartikels mit Angabe der Bezeichnung und der Größe einzelner Untereinheiten.
 b - e. Gruppen von Hexonen.
 f. Einzelne Hexone.
 g. Ein Penton mit Fiber, umgeben von 5 Hexonen.
 h. Pentone mit Fibern.
 Vergrößerung b 160.000fach. 9 mm $\hat{=}$ 90 nm.
 Vergrößerung c - h 480.000fach. 10 mm $\hat{=}$ 20 nm.

3.3.15. Hämagglutination

Das cytopathogene Agens besitzt nicht die Fähigkeit, Erythrozyten von Ratte, Maus, Meerschweinchen, Rind, Geflügel oder Mensch (Blutgruppe 0) zu agglutinieren. Auch nach Veränderung der Konzentration der Erythrozytensuspensionen, des pH-Wertes oder der Temperatur war keine Agglutination der roten Blutkörperchen zu beobachten.

3.3.16. Serologische Untersuchungen

3.3.16.1. Präzipitationsreaktionen in Agargelen

Zum Nachweis präzipitierender Antigene des cytopathogenen Agens mit der Doppeldiffusionsmethode in Agargelen wurden durch PEG 6000-Fällung konzentrierter, mit Arcton 113 gereinigter infektiöser Zellkultur-Überstand, ein Hyperimmunserum gegen das cytopathogene Agens aus Schafen, ein Mischantigen aus verschiedenen Serotypen von Adenoviren des Menschen sowie ein Antiserum gegen verschiedene Adenoviren des Menschen eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 9, oben und in der Mitte, dargestellt. Hieraus wird ersichtlich, daß zwischen dem cytopathogenen Agens und dem homologen Hyperimmunserum 2 Banden auftreten, von denen die dem Antigen fernere übergangslos in eine Bande zwischen dem unbekannten Virus und einem Antiserum gegen Adenoviren des Menschen übergeht und somit gruppenspezifisch ist, während hier die dem Antigen näher liegende fehlt (Abbildung 9, oben), woraus geschlossen werden kann, daß die antigennahe typenspezifisch ist. In entsprechender Weise fehlt diese zweite, typenspezifische Präzipitationslinie zwischen dem Antigen aus Adenoviren des Menschen und dem Hyperimmunserum gegen das cytopathogene Agens (Abbildung 9, Mitte).

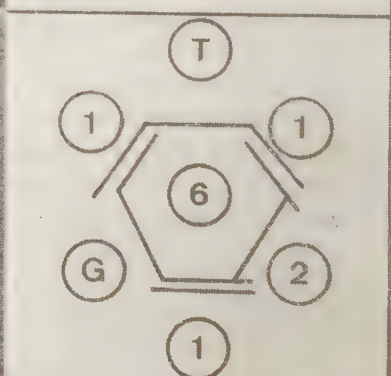
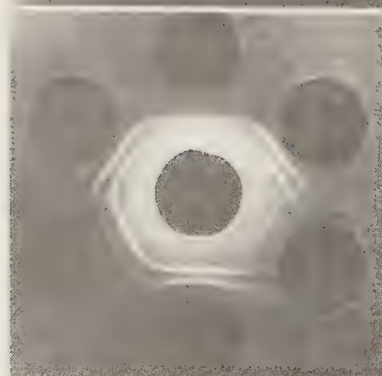
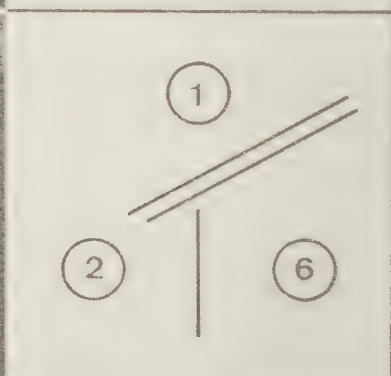
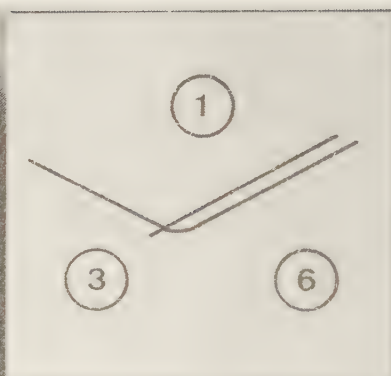


Abbildung 9 : Präzipitationsreaktionen in Agargelen.
Die durch Kreise gekennzeichneten Aus-
stanzungen enthalten folgende Materialien:

1. das cytopathogene Agens, infektiöser
Zellkultur-Überstand, mit PEG 6000 kon-
zentriert und mit Arcton 113 gereinigt.
2. ein Mischantigen aus Adenoviren des
Menschen.
3. ein Antiserum gegen verschiedene Adeno-
viren des Menschen.
6. ein Hyperimmunserum gegen das cytopatho-
gene Agens aus Schafen.
- G. eine durch Ionenaustauschchromatographie
isolierte gruppenspezifische Komponente
des cytopathogenen Agens (Fraktion II).
- T. eine durch Ionenaustauschchromatographie
isolierte typenspezifische Komponente des
cytopathogenen Agens (Fraktion I).

3.3.16.2. Die Untersuchung komplementbindender Eigenschaften
des cytopathogenen Agens

Zum Nachweis eines oder mehrerer komplementbindender Antigene des cytopathogenen Agens wurde mit diesem und einem homologen Hyperimmunserum aus Kaninchen eine Komplementbindungs-Reaktion durchgeführt. Weiterhin wurde, um komplementbindende gruppenspezifische Antigene nachweisen zu können, die dem cytopathogenen Agens und Adenoviren des Menschen gemeinsam sind, ein Mischantigen aus humanen Adenoviren und ein Mischserum gegen verschiedene Serotypen von Adenoviren des Menschen eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 11 zusammengefaßt.

Tabelle 11 : Ergebnisse von Komplexentbindungs-Reaktionen zwischen dem cytopathogenen Agens und einem homologen Hyperimmunserum aus Kaninchen sowie einem Mischantigen aus humanen Adenoviren und einem Mischserum gegen verschiedene Serotypen von Adenoviren des Menschen.

Antigen	Antiserum	KBR-Titer ¹⁾
cytopathogenes Agens	Kaninchen-Hyperimmunserum gegen das cytopathogene Agens	1 : 32
cytopathogenes Agens	Mischserum gegen humane Adenoviren	1 : 8
Mischantigen humaner Adenoviren	Kaninchen-Hyperimmunserum gegen das cytopathogene Agens	1 : 16
Mischantigen humaner Adenoviren	Mischserum gegen humane Adenoviren	1 : 32

¹⁾
(++++ - Hämolyse)

3.3.16.3. Isolierung eines gruppenspezifischen löslichen Antigens durch Ionenaustausch-Chromatographie

Bei der Elution einer Probe aus einem Extrakt infizierter Zellkulturen, aus dem durch wiederholte Ultrazentrifugierung infektiöse Viruspartikeln und leere Hüllen ent-

fernt worden waren, von DEAE-Zellulose mit Hilfe eines linearen Ionenstärke-Gradienten ergaben sich 2 Gruppen von Fraktionen, die eine Extinktion des ultravioletten Lichtes bei einer Wellenlänge von 280 nm aufwiesen. Die bei niedriger Ionenstärke eluierte Gruppe von Fraktionen wurde gesammelt und als Fraktion I, die bei höherer Ionenstärke eluierte entsprechend als Fraktion II bezeichnet.

Die Fähigkeit dieser Fraktionen, in Anwesenheit eines gegen das cytopathogene Agens gerichteten Hyperimmunserums aus Kaninchen oder eines Mischserums gegen verschiedene Adenoviren des Menschen Komplement zu binden, zeigt Tabelle 12.

Das Verhalten beider Fraktionen in der Agargel-Doppeldiffusion ist in Abbildung 9, unten, wiedergegeben. Hierbei befindet sich Fraktion I in der mit T, Fraktion II in der mit G bezeichneten Ausstanzung. Während Fraktion II mit einem gegen das cytopathogene Agens gerichteten Hyperimmunserum ein Präzipitat bildet, das übergangslos in das mit konzentriertem Zellkultur-Überstand gruppenspezifisch reagierende - in dieser Abbildung mit einem Mischantigen aus humanen Adenoviren unter Spornbildung - übergeht, bildet die Fraktion I mit diesem Hyperimmunserum ein Präzipitat, welches in das nur zwischen homologem Antigen und Antiserum vorhandene - typenspezifische - übergeht.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Fraktion I brachte kein Ergebnis, die Untersuchung der Fraktion II zeigte zahlreiche charakteristisch in Gruppen von neun zusammengelagerte Capsomeren (Abbildung 8b, c), die entsprechend der Abbildung 8a Hexone darstellen. Aus diesem Versuch kann geschlossen werden, daß die Hexone des cytopathogenen Agens in der KBR und im Agargel-Doppeldiffusionstest gruppenspezifisch mit Antiseren gegen Adenoviren des Menschen reagieren.

Tabelle 12 : Ergebnisse von Komplementbindungs-Reaktionen mit 2 Fraktionen, die nach Ionenaustausch-Chromatographie erhalten wurden, einem homologen Hyperimmunserum aus Kaninchen und einem Mischserum gegen verschiedene Serotypen von Adenoviren des Menschen.

Antigen	Antiserum	KBR-Titer ¹⁾
Fraktion II	Kaninchen-Hyperimmunserum gegen das cytopathogene Agens	1 : 16
Fraktion II	Mischserum gegen humane Adenoviren	1 : 8
Fraktion I	Kaninchen-Hyperimmunserum gegen das cytopathogene Agens	1 : 4
Fraktion I	Mischserum gegen humane Adenoviren	-

¹⁾
(++++ - Hämolysen)

3.3.16.4. Induktion neutralisierender Antikörper durch das cytopathogene Agens

In Seren von Schafen, die im Rahmen von Pathogenitätsversuchen mit dem cytopathogenen Agens infiziert worden waren, konnten ab dem 7. Tag nach der Infektion neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden.

3.3.16.5. Die Unterscheidung des cytopathogenen Agens von bekannten Adenoviren des Schafes

Aufgrund der Untersuchungsergebnisse der biologischen, chemisch-physikalischen und morphologischen Eigenschaften des cytopathogenen Agens und der serologischen Gemeinsamkeiten mit Adenoviren des Menschen wurde angenommen, daß das untersuchte Isolat ein Adenovirus von Schafen ist. Um dieses mit den 3 von MC FERRAN et al. (1971) beschriebenen Serotypen von Adenoviren des Schafes zu vergleichen, wurden Neutralisationsversuche durchgeführt.

Die Ergebnisse der Serumneutralisations-Versuche sind in Tabelle 13 zusammengefaßt.

Tabelle 13 : Ergebnisse der Serumneutralisations-Versuche mit dem cytopathogenen Agens und 3 bekannten Serotypen von Adenoviren des Schafes (OA 1, OA 2 und OA 3)

Virus	Serum			
	OA 1	OA 2	OA 3	cytop.Ag.
OA 1	1 : 8000 ⁺	<1 : 8 ⁺	<1 : 8 ⁺	nd
OA 2	<1 : 8 ⁺	1 : 16000 ⁺	<1 : 8 ⁺	nd
OA 3	<1 : 8 ⁺	<1 : 8 ⁺	1 : 8000 ⁺	nd
cytop.Ag.	<1 : 2	<1 : 2	<1 : 2	1 : 11000

cytop.Ag. = das cytopathogene Agens

nd = nicht durchgeführt

⁺ = diese Werte sind bei MC FERRAN et al. (1971) angegeben

Die Ergebnisse der Virusneutralisations-Versuche mit 1 : 20 verdünntem Hyperimmunserum gegen das cytopathogene Agens aus Kaninchen, dem cytopathogenen Agens und 3 bekannten Serotypen von Adenoviren des Schafes sind in Tabelle 14 zusammengefaßt und als Neutralisationsindices angegeben.

Tabelle 14 : Neutralisationsindices eines 1 : 20 verdünnten Hyperimmunserums gegen das cytopathogene Agens aus Schafen. Geprüft wurden das cytopathogene Agens und drei bekannte Adenoviren des Schafes (OA 1, OA 2 und OA 3).

Virus	Neutralisationsindex
cytopath. Agens	5,20
OA 1	0,40
OA 2	-0,40
OA 3	0,20

Unter den angegebenen Versuchsbedingungen unterscheidet sich das cytopathogene Agens bei einer Signifikanzschwelle von 0,733 (LORENZ, 1966) signifikant von den 3 bereits bekannten Serotypen von Adenoviren des Schafes.

3.3.17. Pathogenität für Schafe und kleine Versuchstiere

In einer Beobachtungszeit von 2 Wochen nach der Infektion eines Schafes mit dem cytopathogenen Agens zeigte dieses, wie auch ein gemeinsam aufgestalltes Kontrolltier, keine Anzeichen einer klinischen Erkrankung. Auch die dann erfolgte Infektion des Kontrolltieres ergab keine besonderen

klinischen Befunde. Während Versuche, das cytopathogene Agens aus Kot- und Serumproben der infizierten Tiere zu reisolieren, ohne Erfolg blieben, gelang dies mit zellulären Blutbestandteilen vom 3. bis zum 7. Tag nach der Infektion. Hier erreichte das cytopathogene Agens, dessen Identität mit dem zur Infektion benützten Virus durch Serumneutralisations-Versuche kontrolliert wurde, einen Titer von $\log_{10} \text{KID}_{50} 1,7/0,1 \text{ ml}$ am 5. Tag p.i. Die Bildung neutralisierender Antikörper im Serum des zuerst infizierten Schafes setzte am 7. Tag p.i. ein und erreichte nach weiteren 7 Tagen einen Titer von 1 : 340. Im Serum des Kontrolltieres konnten keine neutralisierenden Antikörper nachgewiesen werden. Bei der 6 beziehungsweise 8 Wochen nach der Infektion erfolgten Tötung der Tiere konnten keine pathologischen Befunde erhoben werden. Aus mandibularen und mesenterialen Lymphknoten, den Tonsillen sowie Tracheal- und Bronchialepithel konnte das cytopathogene Agens nicht isoliert werden. Die Infektion kleiner Versuchstiere verursachte in allen Fällen keine klinische Erkrankung. Am ersten Lebenstag subkutan infizierte Hamster werden noch beobachtet.

3.4. Besprechung der Ergebnisse

Die Untersuchung der biologischen, chemisch-physikalischen und morphologischen Eigenschaften eines aus dem Kot klinisch gesunder Lämmer isolierten cytopathogenen Agens ergab, daß dieses Isolat ein Adenovirus ist. Es weist die von GINSBERG (1962) für die Zuordnung eines Virus zur Gruppe der Adenoviren geforderten 3 Hauptmerkmale auf:

1. Es besitzt ein lösliches Antigen, das Adenoviren des Menschen und der Säugetiere gemeinsam ist.
2. Es ist resistent gegen eine Behandlung mit Chloroform.
3. Es verursacht einen charakteristischen cytopathogenen Effekt in Zellkulturen epithelialen Ursprungs.

Auch die von GINSBERG (1962) weiter genannten Bedingungen werden erfüllt: das Virus hat eine Größe von ungefähr 80 nm, ist ein Icosaeder mit 252 Capsomeren und verursacht typische intranucleäre Veränderungen.

GINSBERG (1962) weist darauf hin, daß Adenoviren animalen Ursprungs sich am besten in Zellkulturen der gleichen Spezies vermehren, aus der sie isoliert wurden und in diesen die deutlichsten cytopathogenen Veränderungen verursachen. Während zum Beispiel von MOHANTY (1971) die Vermehrung einiger Serotypen von Adenoviren des Rindes auch in Zellen von Schaf und Ziege - jedoch mit sehr geringer Ausbeute an Infektiosität - berichtet wird, konnte das hier beschriebene Isolat nur in Zellen aus Schaf-Nierenepithelien vermehrt werden, wobei jedoch die Untersuchung der Brauchbarkeit anderer Organe von Schafen zur Virusvermehrung unterblieb. In solchen Zellkulturen konnte nach mehreren Passagen eine deutliche Steigerung der Infektiosität erzielt werden, jedoch ohne daß diese die Titer humaner Adenoviren in kontinuierlichen Zelllinien erreicht hätte.

Das Vermehrungsverhalten des cytopathogenen Agens in der Zellkultur ist charakteristisch für Adenoviren und stimmt vor allem in Bezug auf die relativ lange Eklipse und die nur geringe Freisetzung von Virus aus den Zellen mit den Untersuchungsbefunden zahlreicher Autoren - zum Beispiel GINSBERG (1957), LIEBERMAN und FRIEDMAN (1959), DENNY und GINSBERG (1961) - über das Wachstumsverhalten von Adenoviren des Menschen überein.

Die Einordnung des durch die Virusvermehrung in der Zellkultur verursachten cytopathischen Effektes in einen der von WIGAND und BAUER (1964) genannten 3 Typen ist nur in begrenztem Umfang möglich. Während bei massiver Animpfung von Zellkulturen meist eine Mischform von Rundzell- und Retraktionstyp beobachtet wurde, herrschte vor allem bei verdünnter Animpfung der Rundzelltyp vor. Hieraus kann geschlossen werden, daß der von PEREIRA und KELLY (1957), PEREIRA (1958), ROWE et al. (1958) und anderen Autoren vor allem für den Serotyp 5 der Adenoviren des Menschen beschriebene "Toxin-ähnliche Faktor" nicht oder nur in sehr geringen Mengen vorhanden ist. Dem von WIGAND und BAUER (1964) beschriebenen Sondertyp des CPE ähnliche Veränderungen wurden nicht beobachtet.

Typisch für Adenoviren war die Entwicklung und das Aussehen der in infizierten Zellkultur-Zellen zahlreich vorhandenen intranucleären Einschußkörper, sowohl bei Betrachtung gefärbter Zellen mit dem Lichtmikroskop als auch bei der Untersuchung von Ultradünnschnitten mit dem Elektronenmikroskop. Die in den Zellkernen infizierter Zellen häufig in unmittelbarer Umgebung von Viruspartikeln anzutreffenden elektronendichten Granula scheinen den von MORGAN et al. (1960), WEBER und STICH (1968), MARTINEZ-

PALOMO (1967) und anderen Autoren beschriebenen Proteinstrukturen des Typs II, die in der Nähe der Zellwand gelegenen denen des Typs I zu entsprechen. Zur endgültigen Bestätigung dieser Vermutungen wären jedoch weitergehende histochemische Untersuchungen erforderlich.

Die Behandlung von Virussuspensionen mit organischen Lösungsmitteln, wie Äther oder Chloroform, gibt Aufschluß, ob am Aufbau von Viruspartikeln essentielle Lipide beteiligt sind. Diese Aussage erlaubt eine Trennung in "chloroformstabile" und "chloroformlabile" Viren (FELDMAN und WANG, 1961). Die Chloroformstabilität des cytopathogenen Agens weist darauf hin, daß an seinem Aufbau keine essentiellen Lipide beteiligt sind und ermöglichte es, Proben von Organen oder von Kot durch eine Behandlung mit Chloroform oder Arcton 113 zu reinigen und frei von Bakterien und Pilzen zu machen.

Eine weitere Abgrenzung gegenüber anderen chloroformstabilen Virusarten war durch die Stabilität des Isolates im sauren pH-Bereich gegeben, wie ein Vergleich mit einem Virus der Maul- und Klauenseuche zeigte

Der Einfluß von mono- und bivalenten Kationen auf die Thermoinaktivierung einer Virussuspension bei $+50^{\circ}\text{C}$, jedoch nicht bei $+37^{\circ}\text{C}$, erlaubt mit einigen Einschränkungen (WITTMANN, 1966) eine Unterscheidung zahlreicher Virusarten, zum Beispiel Enteroviren von Adenoviren (WALLIS et al., 1961; WALLIS und MELNICK, 1962). Die Inaktivierung von Enteroviren bei einer Temperatur von $+50^{\circ}\text{C}$ wird durch 1 M Mg^{++} -Ionen, für 1 Stunde auch durch 1 M Na^{+} -Ionen gehemmt, bei REO-Viren wurde sogar ein Anstieg der Infektiosität beschrieben (MC FERRAN et al., 1973),

während die Inaktivierung von Adenoviren und anderen Virusarten durch Na^+ -Ionen gehemmt, durch Mg^{++} -Ionen jedoch beschleunigt wird.

Für morphologische Untersuchungen und zur Bestimmung chemisch-physikalischer Eigenschaften des cytopathogenen Agens war es erforderlich, dieses zu reinigen und zu konzentrieren. Da Vorversuche gezeigt hatten, daß das Agens in infizierten Zellkulturen zum größten Teil zellassoziiert blieb, wurde zellgebundenes Material durch Einfrieren und Auftauen, gefolgt von einer Behandlung mit Arcton 113 (VALENTINE und PEREIRA, 1966; NORRBY, 1966) freigesetzt und infektiöser Zellkultur-Überstand durch Fällung mit PEG 6000 oder durch Sedimentation in der Ultrazentrifuge konzentriert.

Die von STOCKING (1956) beschriebene Verwendung von Polyäthylenglykolen zur Fällung von Proteinen wird als einfaches und billiges Verfahren zur Konzentrierung zahlreicher Virusarten verwendet. KLEMPERER und PEREIRA (1959) sowie NORRBY (1964) beschrieben die Konzentrierung von Adenoviren und deren löslichen Antigenen durch Polyäthylenglykol 6000. Dieses Verfahren, wie auch die Sedimentation von Viruspartikeln in einem Festwinkelrotor, erwies sich zur Reinigung und Konzentrierung von infektiösem Zellkultur-Überstand als sehr wirkungsvoll. Da jedoch die Konzentrierung durch Ultrazentrifugierung einen geringeren Zeitaufwand erforderte, wurde diese Methode bevorzugt.

Die Entfernung von nicht virusspezifischen Proteinen und Lipiden von infektiösem Zellkultur-Material und das Aufschließen von Zellen und Zellkernen durch physikalische Methoden allein ist schwierig. Daher wurde eine auch bei anderen Virusarten übliche Reinigung mit Arcton 113 (GESSLER et al., 1956 zit. FRANKLIN et al., 1959) durchgeführt. Halogenierte Fluorocarbone wie Arcton 113 lösen Lipide,

denaturieren bestimmte Proteine und große Viruspartikeln, ohne jedoch kleine und mittelgroße lipidfreie Viruspartikeln anzugreifen, wenn diese nicht hochgereinigt sind (PHILIPSON, 1967). Der in der vorliegenden Arbeit erzielte Reinigungseffekt ist - verglichen mit den Ergebnissen anderer Arbeiten (zum Beispiel PHILIPSON, 1967) - nicht sehr groß, jedoch war dieser Reinigungsschritt mit einem nur geringen Verlust an Infektiosität verbunden. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß die Präparate nicht hochtourig homogenisiert, sondern nur 20 Minuten lang geschüttelt wurden.

Die weitere Reinigung und Konzentrierung durch Gradienten- und Gleichgewichtszentrifugierung in Cäsiumchlorid glich im wesentlichen den von KÖHLER (1962), GREEN und PINA (1964), WADELL und SKAARET (1967), NORRBY und ANKERST (1969) und anderen Autoren zur Reinigung und Konzentrierung von Adenoviren des Menschen beschriebenen Verfahren.

Die durch Gleichgewichtszentrifugierung ermittelte Dichte kompletter Viruspartikeln liegt mit 1,34 g/ml in dem für zahlreiche Adenoviren des Menschen beschriebenen Dichtebereich. HORZINEK und UEBERSCHÄR (1965) bestimmten die Dichte eines Adenovirus des Schweines in Cäsiumchlorid mit 1,32 g/ml, in Rubidiumchlorid mit 1,33 g/ml; ARDANS et al. (1973) geben die Dichte eines Pferdeadenovirus mit 1,31 g/ml an und die Dichte des Virus der Hepatitis contagiosa canis wird mit 1,35 g/ml angegeben (CARMICHEL, 1964 zit. ARDANS et al., 1973). Die für leere Hüllen ermittelte Dichte liegt mit 1,294 g/ml etwas unter dem Wert für leere Hüllen von Adenoviren des Menschen, deren komplette Partikeln ebenfalls eine Dichte von 1,34 g/ml aufwiesen. Hierbei ist jedoch die Meßgenauigkeit der angewandten Methode zu berücksichtigen.

Das Auftreten zweier eng zusammenliegender Banden im Dichtebereich der leeren Hüllen wird zum Beispiel auch für das

Adenovirus Typ 3 des Menschen beschrieben (PRAGE et al., 1972). Während PRAGE et al. (1972) diese Erscheinung zunächst durch in diesen Dichtebereich sedimentierende Virusuntereinheiten zu erklären versuchten, schlossen sie dann diese Möglichkeit durch geeignete Zentrifugierungsmaßnahmen aus, ohne jedoch eine Ursache für die auch dann immer noch auftretende Doppelbande im Dichtebereich der "inkompletten Partikeln" zu finden.

Die Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten $S_{20,w}$ von Viruspartikeln kann mit verschiedenen Methoden erfolgen. Die Sedimentation im Rohrzucker-Dichtegradienten, die ohne Referenzpräparate mit bekannter $S_{20,w}$ in präparativen Ultrazentrifugen durchgeführt werden kann, ermöglicht es, die Zeit zu bestimmen, in der Partikeln mit bekannter Dichte und bekannter $S_{20,w}$ bei einer bestimmten Umdrehungszahl eine gegebene Wegstrecke in diesem Gradienten zurücklegen. Umgekehrt kann aus dem von den Partikeln zurückgelegten Weg bei Kenntnis mehrerer anderer Faktoren der Sedimentationskoeffizient ermittelt werden. Obwohl dieses Verfahren eine große Meßgenauigkeit erfordert und eine Reihe von Fehlerquellen in sich zeigt, wurde mit einem Sedimentationskoeffizienten $S_{20,w}$ von 775 Svedberg eine gute Übereinstimmung mit den in der Literatur für Adenoviren genannten Werten erreicht.

Die Färbung der Einschlusskörper in infizierten Zellkulturen mit Fluorochromen gab einen deutlichen Hinweis auf eine DNA als Nucleinsäure des cytopathogenen Agens; dies wurde durch die Hemmung der Virussynthese mit JdUrd, den Einbau von ^3H -Thymidin und die DNase-Empfindlichkeit der isolierten Nucleinsäure bestätigt.

In Abwandlung des von ZUR HAUSEN und SOKOL (1969) beschriebenen Verfahrens wurde bei der Isolierung der radioaktiv markierten Nucleinsäure auf eine Phenolextraktion verzichtet, da hierbei hochmolekulare doppelsträngige DNA sehr leicht geschert wird und eine Natriumlaurylsulfat-Pronasebehandlung mit anschließender isopyknischer Zentrifugierung in vielen Fällen eine ausreichende Reinigung darstellt (KAPLAN, 1969).

Die unter den angegebenen Versuchsbedingungen ermittelte Dichte der DNA von 1,711 g/ml und ihr hieraus errechneter Guanin + Cytosin-Gehalt von 52% liegt im Bereich der für schwach onkogene Adenoviren des Menschen ermittelten Werte von 50 bis 53%, wobei jedoch in dieser Gruppe die durch chemische Analysen mit den nach physikalischen Methoden ermittelten Werten des Guanin + Cytosin-Gehaltes nicht genau übereinstimmen (PINA und GREEN, 1965).

Die Anwendung von Natriumlaurylsulfat zur Spaltung von Virusmaterial und die Trennung der Spaltprodukte in Polyacrylamid-Gelen stellt ein relativ einfaches und wirkungsvolles Verfahren zur Untersuchung der Proteinzusammensetzung bestimmter Virusarten dar. Zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichtes und der Wanderungsstrecke Natriumlaurylsulfat-behandelter Proteine besteht eine lineare Beziehung, in welcher der Logarithmus des Molekulargewichtes umgekehrt proportional zur Wanderungsstrecke des Proteines ist (SHAPIRO et al., 1967). Mit Hilfe von Referenzsubstanzen mit bekannten Molekulargewichten kann eine Eichkurve aufgestellt werden, mit der aus der Wanderungsstrecke unbekannter Proteine deren Molekulargewicht geschätzt werden kann. Das Muster der 9 getrennten Proteine des cytopathogenen Agens deckt sich im Wesentlichen mit

den Ergebnissen von Untersuchungen über die Proteinzusammensetzung humaner Adenoviren (MAIZEL et al., 1968; MAIZEL, 1970; LAVER, 1970), weicht jedoch von den Ergebnissen der Untersuchungen von RUSSEL et al. (1971) und EVERITT et al. (1973) ab, die 5 beziehungsweise mindestens 10 verschiedene Proteine beschrieben. Eine in einem Versuch beobachtete 10. Bande mit einem Molekulargewicht zwischen 57.000 und 65.000 Dalton konnte bei weiteren Versuchen nicht mehr beobachtet werden. RUSSEL et al. (1971) ordnen die 5 von ihnen isolierten Proteine Hexonen, Pentonen und Fibern sowie 2 Core-Proteinen zu und erachten andere Proteine als deren Polymere, was jedoch aufgrund der Vielfalt der für Adenoviren des Menschen beschriebenen Antigene unwahrscheinlich erscheint. EVERITT et al. (1973) ordnen den von ihnen mit Hilfe eines diskontinuierlichen Elektrophoresesystems nachgewiesenen niedermolekularen Proteinen eine feste Topographie im Virion zu und schließen das Vorhandensein von Polymeren aus. Deutliche Unterschiede zu den Ergebnissen anderer Autoren sind in den Molekulargewichten der Proteine des hier beschriebenen Adenovirus zu finden, als deren Ursache Unterschiede in den jeweils verwendeten Referenzproteinen zu vermuten sind (WEBER und OSBORN, 1969).

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen des cytopathogenen Agens ergaben die für Adenoviren typischen Strukturmerkmale, sowohl hinsichtlich der Größe und der Gestalt des ganzen Partikels als auch einzelner struktureller Untereinheiten. Mit einer Partikelgröße von 80 nm ist das untersuchte Adenovirus zu den größten dieser Gruppe zu zählen. Durch die Länge der Fibern von 30 nm ist es bezüglich dieser Eigenschaft den Vertretern der Untergruppe III nach ROSEN (1960) der Adenoviren des Menschen ähnlich, da die Fibern dieser Gruppe eine Länge zwischen 28 und 31 nm aufweisen (NORRBY, 1969).

Da Hämagglutinationsversuche mit dem cytopathogenen Agens mit verschiedenen Arten und Konzentrationen von Erythrozyten sowie bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt wurden und der pH-Wert des Milieus unbedeutend ist (ROSEN, 1969), kann das Fehlen hämagglutinierender Aktivität in der oben angedeuteten Ähnlichkeit mit der Untergruppe III der Adenoviren des Menschen begründet sein, da die Angehörigen dieser Gruppe nur in Anwesenheit heterotypischer Antiseren eine deutliche Hämagglutination verursachen. Das Fehlen hämagglutinierender Aktivität animaler Adenoviren wird auch von anderen Autoren, zum Beispiel von HARTLEY und ROWE (1960) und RONDHUIS (1968) beschrieben. MC FERRAN et al. (1971) machen keine Angaben über die Untersuchung dieser Eigenschaften der von ihnen isolierten Adenoviren von Schafen.

Das Vorhandensein eines Antigens in dem untersuchten Virus, das gruppenspezifisch reagiert und auch Adenoviren des Menschen gemeinsam ist, erweist sich aus den Ergebnissen der Präzipitationsreaktionen in Agargelen und der Komplementbindungs-Reaktionen. Dieses gruppenspezifische lösliche Antigen, das allen Adenoviren gemeinsam sein soll (GINSBERG, 1962), jedoch für Adenoviren des Geflügels (NORRBY, 1969) und einige bovine Serotypen (MOHANTY, 1971) nicht nachgewiesen wurde, kann - neben anderen Methoden - durch Ultrazentrifugierung, Immunelektrophorese, Gelfiltration oder Ionenaustausch-Chromatographie isoliert werden und ist eine antigene Eigenschaft der Hexon-Komponenten (NORRBY, 1969). In der vorliegenden Arbeit wurde zu seiner Isolierung eine Ionenaustausch-Chromatographie verwendet, da nur geringe Mengen an Material zur Verfügung standen. Als ein gruppenspezifisch reagierendes Antigen wurden auch

hier Hexone isoliert, die, wie elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben, vorwiegend in Gruppen von 9 vorlagen. Aus der Spornbildung zwischen der gruppenspezifischen Bande des untersuchten Adenovirus und der eines Mischantigens humaner Adenoviren ergibt sich jedoch, daß nur eine teilweise serologische Identität besteht und daß, wie auch für Adenoviren des Menschen festgestellt wurde, Hexone noch andere antigene Eigenschaften haben. Die geringe komplementbindende Aktivität des isolierten typenspezifischen Antigens, das elektronenmikroskopisch nicht dargestellt werden konnte, ist mit einer nicht ausreichenden Reinigung dieser Fraktion durch Ionenaustausch-Chromatographie zu erklären.

Neutralisationsversuche sind zur Bestimmung des Serotyps von Adenoviren sehr gut geeignet, obwohl auch hier - wie bei Komplementbindungs-Reaktionen und Hämagglutinationshemmungstests - Kreuzreaktionen auftreten können (GINSBERG, 1962; WIGAND et al., 1964; NORRBY, 1969). Um schwache Kreuzreaktionen zu erkennen, wird von NORRBY (1969) vorgeschlagen, daß ein "individueller" Serotyp mit homologem Antiserum eine mindestens achtfache oder größere "Reaktivität" aufweisen sollte als dasselbe Antiserum mit einem heterologen Serotyp. Unter Zugrundelegung dieser Bedingung, wie auch der von LORENZ (1966) genannten Signifikanzschwellen und den Ergebnissen der Serumneutralisations-Versuche, durch welche Einwegreaktionen ausgeschlossen werden, kann das hier beschriebene Adenovirus mit Sicherheit als ein neuer Serotyp von Adenoviren des Schafes betrachtet werden. In Analogie zu MC FERRAN et al. (1971) wird die Bezeichnung "OA 4" vorgeschlagen.

Zahlreiche Adenoviren, die aus gesunden Organismen isoliert worden waren, erwiesen sich bei experimenteller Infektion der gleichen Art als apathogen oder erzeugten nur milde

Krankheitserscheinungen, wozu vermutlich Hilfsursachen oder eine bestimmte Disposition der infizierten Organismen erforderlich sind (SOHIER et al., 1965). So konnten zum Beispiel KLEIN et al. (1959, 1960) mit 2 Serotypen boviner Adenoviren (Typen 1 und 2), die aus gesunden Kälbern isoliert worden waren, nach einer experimentellen Infektion von Kälbern keine Krankheitserscheinungen beobachten, während MOHANTY und LILLIE (1965) mit dem bovinen Typ 1 eine milde respiratorische Erkrankung von Kälbern verursachten. Weiterhin ist die Pathogenität einzelner Serotypen für ihre natürlichen und für fremde Wirte sehr unterschiedlich (SOHIER et al., 1965). So scheint zum Beispiel der bovine Serotyp 3 für Rinder stärker pathogen zu sein als andere Serotypen von Adenoviren des Rindes (MATTSON, 1973). MC FERRAN et al. (1971), die 9 Isolate oviner Adenoviren aus Kotproben gesunder und kranker Lämmer isolierten, lassen offen, ob die 3 verschiedenen Serotypen von Tieren mit Krankheitserscheinungen stammen oder nicht und machen keine Angaben über experimentelle Infektionen von Schafen.

Zur Prüfung der Pathogenität des in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Adenovirus für Schafe wurden 2 erwachsene Tiere herangezogen, in deren Seren vor der Infektion keine präzipitierenden oder neutralisierenden Antikörper vorhanden waren. Obwohl nach der intramuskulären Infektion eine schwache Virämie und virusspezifische Antikörper nachzuweisen waren, erkrankten die Tiere nicht. Es wäre jedoch zu weitgehend, hieraus zu schließen, daß dieses Isolat nicht pathogen für Schafe sei. Eine endgültige Klärung dieser Frage wäre erst nach der experimentellen Infektion einer großen Zahl von Lämmern aus verschiedenen Herden möglich, wobei auch verschiedene Infektionsarten, zum Beispiel die orale, nasale oder intratracheale Applikation anzuwenden wären.

Kleine Versuchstiere - ausgenommen Hamster und Mäuse - scheinen nach experimenteller Infektion mit Adenoviren des Menschen nicht zu erkranken (SOHIER et al., 1965). Auch das hier beschriebene Adenovirus des Schafes verursachte in kleinen Versuchstieren keine Krankheitsercheinungen; seine Pathogenität für Hamster - insbesondere seine Fähigkeit zur Tumorbildung - wird noch geprüft.

3.5. Zusammenfassung

1. Aus dem Kot klinisch gesunder Lämmer wurde ein chloroform- und pH-stabiles cytopathogenes Virus isoliert, dessen Thermoinaktivierung bei $+50^{\circ}\text{C}$ durch 1 M Na^{+} -Ionen gehemmt wird, jedoch nicht durch 1 M Mg^{++} -Ionen. Die Färbung virusindizierter intranucleärer Einschußkörper mit Fluorochromen, die mit Thymidin aufzuhebende Hemmung der Synthese von infektiösem Virus durch JdUrd, der Einbau von ^3H -Thymidin in das Virusgenom und die DNase-Empfindlichkeit der isolierten Nucleinsäure zeigen, daß es sich bei dem isolierten Virus um ein DNA-Virus handelt. Infektiöse Partikeln dieses Virus haben eine Flotationsdichte von $1,34\text{ g/ml}$ und eine $S_{20,w}$ von 775 Svedberg. Die Dichte der Nucleinsäure infektiöser Viruspartikeln beträgt $1,711\text{ g/ml}$, woraus sich ein Guanin + Cytosin-Gehalt von 52% ergibt. Nach der Behandlung kompletter Viruspartikeln mit Natriumlaurylsulfat konnten in der PAGE mindestens 9 Proteine nachgewiesen werden. Das Virion ist ein hüllenloser Icosaeder mit 252 Capsomeren mit einem Durchmesser von 80 nm und mit Fibern, die 30 nm lang sind.
2. Das Isolat agglutiniert nicht Erythrozyten von Ratte, Maus, Meerschweinchen, Hammel, Geflügel oder Mensch (Blutgruppe O).
3. Das cytopathogene Agens hat ein lösliches Antigen, das nach den Ergebnissen von Agargelpräzipitationen und Komplementbindungs-Reaktionen auch in Adenoviren des Menschen vorhanden ist. Dieses gruppenspezifische An-

tigen wurde durch Ionenaustausch-Chromatographie isoliert und erwies sich als eine antigene Eigenschaft von Hexonen.

4. Das isolierte Virus vermehrt sich mit der Entwicklung eines für Adenoviren typischen CPE in Zellkulturen von Schafnieren, jedoch nicht in primären Zellkulturen von Kälbernieren oder Kälberhoden und auch nicht in Hühnerembryofibroblasten oder in BHK 21-, MDCK 65- oder PK 15-Zell-Linien.
5. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde das isolierte Agens als ein Adenovirus von Schafen charakterisiert, das sich nach den Ergebnissen von Neutralisationsversuchen signifikant von den 3 bekannten Serotypen von Adenoviren des Schafes unterscheidet. In Analogie zu MC FERRAN et al. (1971) wird für diesen Serotyp die Bezeichnung "OA 4" vorgeschlagen.
6. Nach der Infektion von Schafen, von Mäusen verschiedenen Alters, von Meerschweinchen und von Kaninchen mit diesem Adenovirus wurden keine Krankheitserscheinungen beobachtet. Die Untersuchung der Pathogenität für neugeborene Hamster ist noch nicht abgeschlossen.

4. Schrifttum

ANDREWES, C.H. & D.M. HORSTMANN (1949):

The susceptibility of viruses to ethyl ether.

J.gen.Microbiol. 3, 290-297.

ARCHETTI, I. & D. STEVE-BOCCIARELLI (1963):

Structure of some simian adenoviruses.

Virology 20, 399-404.

ARDANS, A.A., R.F. PRITCHETT & Y.C. ZFF (1973):

Isolation and characterization of an equine adenovirus.

Infect.Immunity 7, 673-677.

BAUER, H. & R. WIGAND (1963):

Eigenschaften der Adenovirus-Hämagglutinine.

Z.Hyg.Infekt.-Kr. 149, 96-113.

BAUER, H., R. WIGAND & W. ADAM (1964):

Lösliche und virusgebundene Adenovirus-Hämagglutinine.

Z.Naturforsch. 19b, 587-593.

BAUER, H. & D.P. BOLOGNESI (1970):

Polypeptides of avian RNA tumor viruses.

II. Serological characterization.

Virology 42, 1113-1126.

BAUER, K. (1972):

persönliche Mitteilung.

BELL, T.M., G. TURNER, A. MAC DONALD & D.A. HAMILTON (1960):

Type 3 adenovirus infection.

Lancet 2, 1327-1329.

BETTINOTTI, C.M. & O.C. STRAUB (1966):

Experimentelle Infektionen von Rindern mit humanem Adenovirus (Typ 1).

Zbl.Bakt., I.Abt.Orig. 199, 427-431.

ETTS, A.O., A.R. JENNINGS, P.H. LAMONT & Z. PAGE (1962):

Inoculation of pigs with adenoviruses of man.

Nature (Lond.) 193, 45-46.

BIBRACK, B. (1965):

Isolierung und Charakterisierung eines Adenovirus aus Nieren vom Schwein.

Vet.Med.Diss. München.

BIBRACK, B. (1969):

Untersuchungen über die serologische Einordnung von 9 in Bayern aus Schweinen isolierten Adenovirus-Stämmen.

Zbl.Vet.-Med. 16, 327-334.

BÜGEL, K. & A. MAYR (1961):

Der Chloroform-Resistenztest zur Isolierung und Charakterisierung von Enteroviren.

Zbl.Bakt., I.Abt.Orig. 182, 564-570.

BOYER, G.S., C. LEUCHTENBERGER & H.S. GINSBERG (1960):

Cytological and cytochemical studies of HeLa cells infected with adenoviruses.

J.exp.Med. 105, 195-216.

BJLLOCK, G. (1965):

An association between adenoviruses isolated from simian tonsils and episodes of illness in captive monkeys.

J.Hyg. (Lond.) 63, 383-387.

CABASSO, V.J. & B.I. WILNER (1969):
Adenoviruses of animals other than man.
Advanc.vet.Sci. 13, 159-217.

CHARDONET, Y. & S. DALES (1970):
Early events in the interaction of adenoviruses with
HeLa cells.
I. Penetration of type 5 and intracellular release of
the DNA genome.
Virology 40, 462-477.

CLARK, F.H., F. MICHALSKI, K.S. TWEEDELL, D. YOHN &
R.F. ZEIGEL (1973):
An adenovirus, FAV-1, isolated from the kidney of a
frog (*Rana pipiens*).
Virology 51, 392-400.

CLEMMER, D.I. (1964):
Characterization of agents isolated from market chickens
in a quest for enteritic viruses.
J.infect.Dis. 114, 386-400.

DARBYSHIRE, J.H. (1966):
Oncogenicity of bovine adenovirus type 3 in hamsters.
Nature (Lond.) 211, 102.

DARBYSHIRE, J.H. & H.G. PEREIRA (1964):
An adenovirus precipitating antibody present in some
sera of different animal species and its association
with bovine respiratory disease.
Nature (Lond.) 201, 895-897.

ARYE, IRE, J.H., A.N. JENNINGS, P.C. JARSON, P.H. LAMONT
& A.H. CHAM (1966):

The pathogenesis and pathology of infection in calves with
a strain of bovine adenovirus type 3.

Res.Vet.Sci. 7, 81-83.

JENNY, F.W. & H.S. GINSBERG (1961):

Certain biological characteristics of adenoviruses types
5, 6, 7, and 14.

J.Immunol. 86, 567-574.

DUNCAN, I.B.R. & J.G.B. HUTCHINSON (1961):

Type 3 adenovirus infection with gastrointestinal symptoms.

Lancet 1, 530-532.

ENDERS, J.F., J.A. BELL, J.H. DINGLE, T. FRANCIS JR.,

M.R. HILLEMAN, R.J. HUEBNER & A.M.M. PAYNE (1956):

"Adenoviruses", group name proposed for new respiratory-
tract viruses.

Science 127, 148.

EUGSTER, A.K., S.S. KALTER, C.S. KIM & M.E. PINKERTON (1969):

Isolation of adenoviruses from baboons (*Papio* sp.) with
respiratory and enteritic infections.

Arch.ges.Virusforsch. 26, 260-270.

EPSTEIN, M.A., S.J. HOLT & A.K. POWELL (1960):

The fine structure and composition of type 5 adenovirus;
an integrated microscopical and cytochemical study.

Brit.J.exp.Path. 41, 567-575.

EVANS, J.A., M. APPEL & J.B. SMITH (1967):

The effects of viruses on intraocular tissues.

I. Infections with the virus of fox encephalitis (canine hepatitis).

J.infect.Dis. 96, 1-11.

EVERITT, E., B. SUNDQUIST, C. PETERSON & J. PHILLIPS (1973):

Structural proteins of adenoviruses.

X. Isolation and topography of low molecular weight antigens from the virion of adenovirus type 2.

Virology 52, 130-147.

FELDMAN, H.A. & S.S. WANG (1961):

Sensitivity of various viruses to chloroform.

Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 106, 736-740.

FLANAGAN, J.F. & H.S. GINSBERG (1961):

Effect of 5-fluorodeoxyuridine on synthesis of type 4 adenovirus.

Fed.Proc. 20, 445.

die selben (1962):

Synthesis of virus specific polymers in adenovirus infected cells: effect of 5-fluorodeoxyuridine.

J.exp.Med. 116, 141-157.

FONG, C.K.Y., K.G. BENSCH, L.R. MILLER & G.D. HSIUNG (1965):

Microscopy of the release of a simian adenovirus.

J.Bact. 90, 1786-1789.

FRANKLIN, R.M., L. WECKER & S. HENRY (1959):
Some properties of an infectious ribonucleic acid from
mouse encephalomyelitis virus.
Virology 1, 220-235.

FUJINAGA, K. & M. GREEN (1967):
Mechanism of viral carcinogenesis by DNA mamalian viruses.
IV. Related virus specific ribonucleic acids in tumor cells
induced by "highly" oncogenic adenovirus types 12, 18, 31.
J.Virol. 1, 576-582.

GILDEN, R.V., J. KERN, T.G. BEDDOW & R.J. HUEBNER (1967):
Bovine adenovirus type 3: detection of specific tumor and
T antigens.
Virology 31, 727-729.

GINSBERG, H.S. (1956):
Characteristics of the new respiratory viruses (adenovi-
ruses).
II. Stability to temperature and pH alterations.
Proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.) 93, 48-52.

GINSBERG, H.S. (1962):
Identification and classification of adenoviruses.
Virology 18, 312-319.

GINSBERG, H.S. in K. HABEL & N.P. SALZMAN (1969):
Fundamental techniques in virology.
Academic Press, New York und London, 390-398.

GINSBERG, H.S., H.S. PEREIRA, H. VALENTINE & W.C. WILCOX (1966):

A proposed terminology for the adenovirus antigens and virion subunits.

Virology 28, 782-783.

GINSBERG, H.S., L.J. BELLO & A.J. LEVINE in J.C. DOLIVER & W. PARANCHYCH (1967):

The molecular biology of viruses.

Academic Press, New York and London, 547-572.

GREEN, R.G. (1931):

Epizootic encephalitis of foxes.

II. General considerations of fur-range epizootics.

Amer.J.Hyg. 13, 201-223.

GREEN, M. (1962):

Biochemical studies on adenovirus multiplication.

III. Requirement for DNA synthesis.

Virology 18, 601-613.

GREEN, M. in F.L. HORSFALL, JR. & I. TAMM (1965):

Viral and rickettsial infections of man.

Lipincott, Philadelphia, 145-174.

GREEN, M. (1966):

Biosynthetic modifications induced by DNA animal viruses.

Ann.Rev.Microbiol. 20, 189-222.

GREEN, M. & M. PINA (1963):

Biochemical studies on adenovirus multiplication.

IV. Isolation, purification and chemicals analysis of adenovirus.

Virology 20, 199-207.

dieselben (1964):

Biochemical studies on adenovirus multiplication.

VI. Properties of highly purified tumorigenic human adenoviruses and their DNA's.

Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.) 51, 1251-1259.

GREEN, M., M. PINA, R. KIMES, P.C. WENSINK, L.A. MAC HATTIE & C.A. THOMAS JR. (1967):

Adenovirus DNA.

I. Molecular weight and conformation.

Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.) 57, 1302-1309.

PAIG, D.A., M.C. CLARKE & M.S. PEREIRA (1964):

Isolation of an adenovirus from a pig.

J.comp.Path. 74, 81-84.

HARTLEY, J.W. & W.P. ROWE (1960):

A new mouse virus apparently related to the adenovirus group.

Virology 11, 645-647.

HAYASHI, K. & W.C. RUSSEL (1968):

A study of the development of the adenovirus antigens by the immunofluorescent technique.

Virology 34, 470-480.

HERRMANN, E.G., JR. (1961):

Plaque inhibition test for detection of specific inhibitors of DNA containing viruses.

Proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.) 107, 142-145.

HORNE, R.W., S. BRENNER, A.P. WATERSON & P.WILDY (1959):

The icosahedral form of an adenovirus.

J.molec.Biol. 1, 84-86.

HORWITZ, M.S., M.D. SCHARF & J.V. MEIZEL JR. (1969):

Synthesis and assembly of adenovirus 2.

I. Polypeptide synthesis, assembly of capsomeres and morphogenesis of the virion.

Virology 39, 682-694.

HORZINEK, M. & S. UEBERSCHÄR (1966):

Charakterisierung eines Schweineadenovirus im Zusammenhang mit Untersuchungen über das Virus der europäischen Schweinepest.

Arch.ges.Virusforsch. 18, 406-421.

HUEBNER, R.J., W.P. ROWE, T. WARD, R.H. PARROT & J.A. BELL (1954):

Adenoidal-pharyngeal-conjunctival agents. A newly recognized group of common viruses of the respiratory system.

New Engl.J.Med. 251, 1077-1086.

HUEBNER, R.J., W.P. ROWE & W.T. LANE (1962):

Oncogenic effects in hamsters of human adenovirus types 12 and 18.

Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.) 48, 2051-2058.

HULL, R.W., I.S. JOHNSON, C.B. CULBERTSON, C.B. REIMER
& R.E. ADLERT (1955):

Oncogenicity of simian adenoviruses.

Science 150, 1044-1046.

JASSETZ, E., L. HANNA, S.J. KIMURA & P. THYGESON (1955):

Studies on the etiology of epidemic keratoconjunctivitis.

Amer.J.Ophthal. 40, 200-209.

JASSETZ, E., J.L. MELNICK & E.A. ADELBERG (1968):

Medizinische Mikrobiologie, 2. Auflage.

Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

KÄRBER, G. (1931):

Beiträge zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path.Pharmak. 162, 480.

KAPLAN, A.S. in K. HABEL & N.P. SALZMAN (1969):

Fundamental techniques in virology.

Academic Press, New York und London, 487-495.

KAPSENBERG, J.G. (1959):

Relationship of infectious canine hepatitis virus to human adenoviruses.

Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 101, 611-614.

KAWAMURA, H. & H. TSUBAHARA (1963):

Serological relationship between CELO and GAL viruses.

Nat.Inst.Anim.Hlth.Quart. 3, 77-82.

KEEBLE, S.A. & R.F. JAY (1962):

Fluorescent staining for the differentiation of intracellular RNA and DNA.

Nature (Lond.) 193, 695-696.

KIM, C.S., E.A. SUELTFUSS & S.S. KALTER (1967):

Isolation and characterization of simian adenoviruses isolated in association with an outbreak of pneumoenteritis in vervet monkeys.

J.infect.Dis. 117, 292-300.

KJELLEN, L. (1965):

Stabilization in acid of mercaptoethanol-reduced adenovirus antibody by combination with virus.

Virology 27, 580-588.

KJELLEN, L., G. LAGERMALM, A. SVEDMYR & K.G. THORSSON (1955):
Crystalline-like patterns in the nuclei of cells infected with an animal virus.

Nature (Lond.) 175, 505-507.

KJER, P. & C.H. MORDHORST (1961):

Studies on an epidemic of kerato-conjunctivitis caused by adenovirus type 8.

II. Clinical and epidemiological aspects.

Acta ophthalm.(Kbh.) 39, 984-992.

KLEIN, M. (1962):

The relationship between two bovine adenoviruses to human adenoviruses.

Ann. N.Y.Acad.Sci. 101, 493-497.

KLEIN, M., R. EARLEY & J. ZILAT (1959):

Isolation from cattle of a virus related to human adenovirus.

Proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.) 102, 1-4.

KLEIN, M., J. ZELLAT & T.C. MICHAELSON (1960):

A new bovine adenovirus related to human adenovirus.

Proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.) 105, 340-342.

KLEMPERER, H.G. & H.G. PEREIRA (1959):

Study of adenovirus antigens fractioned by chromatography on DEAE-cellulose.

Virology 9, 536-545.

KÖHLER, K. (1962):

Gewinnung und Reinigung von Adenovirus Typ 2 mit Hilfe der CsCl-Gradientenzentrifugation.

Z.Naturforsch. 17, 544-547.

KÖHLER, K. & T. ODAKA (1964):

Zeitpunkt der Synthese und Zusammensetzung der messenger-RNS bei KB-Zellen nach Adenovirus-Infektion.

Z.Naturforsch. 19b, 331-336.

KUNISHIGE, T., T. SHIMIZU & K. HIRATO (1960):

Purification studies on the infectious canine hepatitis virus.

I. Viral particles in tissue culture fluid revealed by one purification procedure.

Jap.J.vet.Res. 8, 202-212.

KRETZSCHMAR, C.H. (1973):

Über einen neuen Typ oviner Adenoviren.

Arch.exp.Vet.-Med. 27, 197-201.

LAGERMALM, T., L. KJELLEN & A. SVEDMYR (1957):

Electron microscopy of HeLa cells infected with agents of adenovirus (APC-R1-ARD) group.

Arch.ges.Virusforsch. 7, 221-241.

LAVER, W.G. (1970):

Isolation of an arginine-rich protein from particles of adenovirus type 2.

Virology 41, 488-500.

LAWRENCE, W.C. & H.S. GINSBERG (1967):

Intracellular uncoating of type 5 adenovirus DNA.

J.Virol. 1, 851-867.

LIEBERMAN, M. & M. FRIEDMAN (1959):

Growth characteristics of adenoviruses.

I. Production and release of complement-fixing antigen and infectious virus.

J.Immunol. 82, 1-8.

LORENZ, R.J. (1960):

Untersuchungen über die Dosis-Wirkungsbeziehungen und die Genauigkeit bei Virustitrierungen.

Arch.ges.Virusforsch. 10, 560-577.

LOW, B. & P.R. PINNOCK (1956):

The packing structure of crystalline R1-APC virus.

J.biophys.biochem.Cytol. 2, 483-486.

LEARY, C.H., N.O. ROSENGOLD, A.L. FARR & R.J. RANDALL (1951):

Protein measurement with the folin phenol reagent.
J.Biol.Chem. 193, 265-275.

MAHNEL, H. & B. BIEBACK (1966):

Isolierung von Adenoviren aus Zellkulturen von Nieren gesunder Schlachtschweine.

Zbl.Bakt., 1.Abt.Orig. 199, 329-338.

MAIZEL, J.V., J. J., J.O. WHITE & M.D. SCHARF (1968):

The polypeptides of adenoviruses.

1. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A and 12.

Virology 36, 126-136.

MÄNTYJÄRVI, R. & W.C. RUSSEL (1969):

Studies on DNA synthesis in cells infected with adenovirus.

J.gen.Virol. 5, 339-350.

MARTINEZ-PALOMO, P., J. LE BUIS & W. BERNHARD (1967):

Electron microscopy of adenovirus type 12 replication.

1. Fine structural changes in the nucleus of infected KB cells.

J.Virol. 1, 817-829.

MATTSON, D.E. (1973):

Adenovirus infection in cattle.

J.Amer.vet.med.Ass. 163, 894-896.

MAYOR, H.D. & A.R. DIWAN (1961):

Studies on the acridine orange staining of two purified RNA viruses: poliovirus and tobacco mosaic virus.

Virology 14, 74-82.

MAYR, A., B. BIBRACK und P. BACHMANN (1967):

Züchtung von Schweineadenoviren in Kälbernierenkulturen.

Zbl.Bakt., 1.Abt.Orig. 203, 60-68.

MC ALLISTER, R.M., M.O. NICOLSON, G. REED, J. KERN, R.V.

GILDEN & R.J. HUEBNER (1969):

Transformation of rodent cells by adenovirus 18 and other group D adenoviruses.

J.nat.Cancer Inst. 43, 917-923.

MC EWEN, C.R. (1967):

Tables for estimating sedimentation through linear concentration gradients of sucrose solution.

Ann.Biochem. 20, 114-149.

MC FERRAN, J.B., R. NELSON, J.M. MC CRACKEN & J.G. ROSS

(1969):

Viruses isolated from sheep.

Nature (Lond.) 221, 194-195.

MC FERRAN, J.B., R. NELSON & E.R. KNOX (1971):

Isolation and characterization of sheep adenoviruses.

Arch.ges.Virusforsch. 35, 232-241.

MC FERRAN, J.B., R. NELSON & J.K. CLARKE (1973):

Isolation and characterization of reovirus isolated from sheep.

Arch.ges.Virusforsch. 40, 72-81.

MOHANTY, S.B. (1971):

Comparative study on bovine adenoviruses.

Amer.J.vet.Res. 32, 1899-1905.

MOHANTY, S.B. & M.G. LILLIE (1965):

Experimental infection of calves with a bovine adenovirus.

Proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.) 120, 679-682.

MORGAN, C., G.C. GODMAN, H.M. ROSE, C. HOWE & H.S. HUANG (1957):

Electron microscopic and histochemical studies of an unusual protein occurring in cells infected by type 5 adenovirus.

J.biophys.biochem.Cytol. 3, 505-508.

MORGAN, C., H.S. ROSENKRANZ & B. MEDNIS (1969):

Structure and development of viruses as observed in the electron microscope.

X. Entry and uncoating of adenovirus.

J.Virol. 4, 777-796.

NORRBY, E. (1966):

The relationships between the soluble antigens and the virions of adenovirus type 3.

I. Morphological characteristics.

Virology 28, 236-248.

derselbe (1969):

The structural and functional diversity of adenovirus capsid components.

J.gen.Virol. 5, 221-236.

derselbe in

Comparative virology.

Academic Press, New York und London, 105-134.

NORRBY, W. & J. ANKERST (1969):

Biological characterization of structural components of adenovirus type 12.

J.gen.Virol. 5, 183-194.

NORRBY, E., M. GRÖNBERG & P. MAGNUSSON (1964):

Virus-specific products appearing during the multiplication of adenovirus type 3.

Unio Nordica Contra Cancrum, Symposium on Virus and Cancer, 118-124.

OSLER, A.G., M.M. MAYER & M. HEIDELBERGER (1948):

Quantitative studies of complement fixation.

II. Fixation of complement in the reaction between type III pneumococcus specific polysaccharide and homologous antibody.

J.Immunol. 60, 205-212.

OTTE, P. (1971):

Untersuchungen über die Thermostabilität kompletter Viren.

Zbl.Bakt., I.Abt.Orig. 217, 441-445.

OUCHTERLONY, Ö. (1948):

Antigen-antibody reactions in gels.

Ark.Kemi, Miner.,Geol. 26B, 1-9.

PARRY, H.L. & L.M. LARIN (1951):

The natural history of virus hepatitis of dogs (Rubarth's disease).

Vet.Rec. 63, 933-946.

PEREIRA, H.G. & R. KELLY (1957):

Latent infection of rabbits by adenovirus type 5.

Nature (Lond.) 180, 615-617.

PEREIRA, H.G. & M.V.T. DE FIGUEIREDO (1962):

Mechanism of hemagglutination by adenovirus types 1, 2, 4, 5, and 6.

Virology 18, 1-8.

PETTERSON, U. & S. HÖGLUND (1969):

Structure proteins of adenoviruses.

III. Purification and characterization of adenovirus type 2 penton antigen.

Virology 39, 90-106.

PETTERSON, U., L. PHILIPSON & S. HÖGLUND (1967):

Structural proteins of adenoviruses.

I. Purification and characterization of the adenovirus type 2 hexon antigen.

Virology 33, 575-590.

PETZOLD, K. & R. SCHMIDT (1971):

Nachweis von Adenovirus-Partikeln beim Pferd.

Arch.ges.Virusforsch. 35, 392-394.

PHILIPSON, L. (1968):

Separation on DEAE-cellulose of components associated
adenovirus reproduction.

Virology 10, 459-456.

PHILIPSON, L. in K. MARAMOROSCH & H. KOPROWSKI (1967):

Methods in Virology II

Academic Press, New York und London, 235-244.

PHILIPSON, L., K. LONBERG-HOLM & U. PETTERSON (1968):

Virus receptor interaction in an adenovirus system.

J.Virol. 2, 1064-1075.

PINA, M. & M.G. GREEN (1965):

Biochemical studies on adenovirus multiplication.

IX. Chemical and base composition analysis of 28 human
adenoviruses.

Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.) 54, 547

POLASA, H. & M. GREEN (1965):

Biochemical studies on adenovirus multiplication.

VII. Analysis of protein synthesis.

Virology 25, 68-79.

PRAGE, L., S. HÖGLUND & L. PHILIPSON (1972):

Structural proteins of adenoviruses.

Virology 49, 745-757.

PRIER, J.E. & R.W. LE BEAU (1958):

Studies on the serologic identification of adenoviruses.

I. Comparison of the hemagglutination, conglutinating
complement adsorption and complement-fixation tests.

J.Lab.clin.Med. 51, 495-500.

RAFAJKO, R.R. (1964):

Production and standardization of adenovirus types 1
to 18 reference sera.

Amer.J.Hyg. 79, 310.

RAPP, F. & J.L. MELNICK (1966):

Papovavirus SV 40, Adenovirus and their hybrids: trans-
formation, complementation, und transcapsidation.

Progr.med.Virol. 8, 349-399.

REEVES, W.C., R.P. SCRIVANI, W.E. PUGH & W.P. ROWE (1967):

Recovery of an adenovirus from a feral rodent *Peromyscus
maniculatus*.

Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 124, 1173-1175.

ROLFE, R. & M. MESELSON (1959):

The relative homogeneity of microbial DNA.

Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.) 45, 1039-1043.

ROLLE, M. & A. MAYR (1966):

Mikrobiologie und Allgemeine Seuchenlehre (3. Auflage)

Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.

ROMEIS, B. (1968):

Mikroskopische Technik (16. Auflage)

Oldenbourg Verlag, München, Wien.

RONDHUIS, P.R. (1968):

A new bovine adenovirus.

Arch.ges.Virusforsch. 25, 235-236.

ROOS, R., S.M. CHOU, N.G. ROGERS, M. BASHIGHT & D.C. GAJ-
DUSEK (1972):

Isolation of an adenovirus 32 strain from human brain in
a case of subacute encephalitis.

Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 139, 636-640.

ROSE, J.A., P.R. REICH & S.M. WEISSMAN (1965):

RNA production in adenovirus-infected KB cells.

Virology 27, 571-579.

ROSEN, L. (1958):

Hemagglutination by adenoviruses.

Virology 5, 547-577.

derselbe (1960):

A hemagglutination-inhibition technique for typing
adenoviruses.

Amer.J.Hyg. 71, 120-128.

derselbe in K. HABEL & N.P. SALZMAN (1969):

Fundamental techniques in virology.

Academic Press, New York und London, 276-287.

ROSEN, L., J.F. HOVIS & J.A. BELL (1962):

Further observation on typing adenoviruses and a descrip-
tion of two possible additional serotypes.

Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 110, 710-713.

ROUSE, H.C. & R.W. SCHLESINGER (1967):

An arginine-dependent step in the maturation of type 2
adenovirus.

Virology 33, 513-522.

ROWE, W.D. & J.L. HARTLEY (1962):

A general review on the adenoviruses.

Ann.N.Y.Acad.Sci. 101, 466-474.

ROWE, J.P., R.J. HUEBNER, L.K. GILMORE, R.H. PARROT & T.G. WARD (1953):

Isolation of a cytopathic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture.

Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 84, 570-573.

RUEARTH, S. (1947):

An acute virus disease with liver lesions in dogs (hepatitis contagiosa canis). A pathologico-anatomical and etiological investigation.

Acta path.microbiol.scand. (suppl.) 69, 122-123.

RUSSEL, W.C. & Y. BECKER (1968):

A maturation factor for adenoviruses.

Virology 35, 18-27.

RUSSEL, W.C., R.C. VALENTINE & H.G. PEREIRA (1967):

The effect of heat on the anatomy of the adenovirus.

J.gen.Virol. 1, 509-522.

RUSSEL, W.C., K. MC INTOSH & J.J. SKFHEL (1971):

The preparation and properties of adenovirus cores.

J.gen.Virol. 11, 35-46.

SARMA, P.S., R.J. HUEBNER & W.T. LANE (1965):

Induction of tumors in hamsters with an avian adenovirus (CELO).

Science 149, 1108.

SCHILDKRAUT, C.L., J. MARBUR & P. DOTY (1962):

Determination of the base composition of DNA from its buoyant density in CsCl.

J.mol.Biol. 4, 430-443.

SCHLESINGER, R.W. (1969):

Adenoviruses: the nature of the virion and of controlling factors in productive or abortive infection and tumorigenesis.

Advanc.Virus Res. 14, 1-61.

SCHMIDT, N.J., C.J. KING & E.H. LENETTE (1965):

Hemagglutination and hemagglutination inhibition with adenovirus type 12.

Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 118, 208-211.

SHAPIRO, A.L., E. VINUELA & J.V. MAIZEL JR. (1967):

Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels.

Biochem.Biophys.Res.Comm. 28, 815-820.

SHARPE, H.B. & D.M. JESSET (1967):

Experimental infection of pigs with 2 strains of porcine adenovirus.

J.comp.Path. 77, 45-50.

SHARPLESS, G.R. & E.L. JUNGHERR (1961):

Characterization of two viruses obtained from lymphomatous liver.

Amer.J.vet.Res. 22, 937-943.

SINHA, S.K., L.W. FLEMING & S. SCHLES (1960):
Role of animals in relation to human viral diseases.
J.Amer.vet.med.Ass. 136, 481-485.

SMITH, K.O. (1965):
Cyclic structure of adenovirus DNA.
Science 198, 100-102.

SMITH, K.O., W.D. GEHLE & M.D. TROUSDALE (1965):
Architecture of the adenovirus capsid.
J.Bact. 90, 254-261.

SOHIER, R., Y. CHARDONNET & PRUNIERAS (1965):
Adenoviruses. Status of current knowledge.
Progr.med.Virol. 7, 253-325.

STASNY, J.T., A.R. NEURATH & B.A. RUBIN (1968):
Effect of formamide on the capsid morphology of adenovirus
types 4 and 7.
J.Virol. 2, 1429-1442.

STOCKING, C.P. (1956):
Praecipitation of enzymes during isolation of chloroplasts
in Carbowax.
Science 123, 1032-1033.

STÖHR, M. & R. WIGAND (1965):
Untersuchungen über Adenovirus-Hämagglutinine der Gruppe I
nach Rosen.
Arch.ges.Virusforsch. 17, 20-28.

STROHMAIER, K. (1972):

Einführung in die Zentrifugationstechnik 20.3. - 24.3.1972
und 1.4. - 20.4.1972. Kursus für auswärtige Wissenschaftler,
BFA Tübingen.

STUART-HARRIS, C.H. (1958):

The adenoviruses and respiratory disease in man.
Lect.sci.Basis Med. 8, 148-164,

SUN, C.N. (1972):

Paracrystalline formation in cells infected by adenovirus
type 12.

Zbl.Bakt., 1.Abt.Orig. 219, 141-150.

SUOEKA, N., J. MARMUR & P. DOTY (1959):

Heterogeneity deoxyribonucleic acids.

II. Dependence of the density of the deoxyribonucleic acids
on guanosine + cytosine content.

Nature (Lond.) 183, 1429-1431.

SYVERTON, J.T. (1961):

Cellular response to viral infections.

Path.Biol. 9, 685-689.

SWANGO, L.J., G.A. EDDY & L.N. BINN (1969):

Serologic comparisons of infectious canine hepatitis
and Toronto A 26/61 canine adenovirus.

Amer.J.vet.Res. 30, 1381-1387.

THOMAS, D.C. & M. GREEN (1966):

Biochemical studies on adenovirus multiplication.

XI. Evidence of a cytoplasmatic site for the synthesis
of viral-coded proteins.

Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.) 56, 243-246.

TOSS, J.T. (1962):

Comments on rhinoviruses and parainfluenza viruses of horses.

J.Amer.vet.med.Ass. 155, 387-390.

TRENTIN, J.J., Y. YABE & G. TAYLOR (1962):

The quest for human cancer viruses.

Science 137, 835-841.

VALENTINE, R.G. & H.G. PEREIRA (1965):

Antigens and structure of the adenoviruses.

J.Mol.Biol. 13, 13-20.

VAN DER EB, J. & L.W. VAN DER KESTEREN (1966):

Structure and molecular weight of the DNA of adenovirus type 5.

Biochem.Biophys.Acta 129, 441-444.

VELICER, L.F. & H.S. GINSBERG (1968):

Cytoplasmatic synthesis of type 5 adenovirus capsid proteins.

Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.) 61, 1264-1271.

die selben (1970):

Synthesis, transport and morphogenesis of type 5 capsid proteins.

J.Virol. 5, 338-352.

WALLIS, C., C.-S. YANG & J.L. MELNICK (1962):

Effects of cations on thermal inactivation of vaccinia, herpes simplex and adenoviruses.

J.Immunol. 89, 41-46.

WEBER, J. & H.F. STICH (1969):

Electron microscopy of cells infected with adenovirus type 2.

J.Virol. 3, 198-204.

WEBER, K. & M. OSBORN (1969):

The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

J.Biol.Chem. 244, 4406-4412.

WIGAND, R. & H. BAUER (1964):

Über den cytopathogenen Effekt der Adenoviren des Menschen.

Arch.ges.Virusforsch. 14, 674-682.

WIGAND, R., H. BAUER, F. LANG & W. ADAM (1965):

Neutralization of the adenoviruses type 1 to 18: specificity and antigenic relationships.

Arch.ges.Virusforsch. 15, 188-199.

WIGAND, R. & D. FLIEDNER (1968):

Serologically intermediate adenovirus strains: a regular feature of group II adenoviruses.

Arch.ges.Virusforsch. 24, 245-256.

WILCOX, W.C. & H.S. GINSBERG (1961):

Purification and immunological characterization of types 4 and 5 adenovirus soluble antigens.

Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.) 47, 512-526.

dieselben (1963):

Structure of type 5 adenovirus.

I. Antigenic relationships of virus structural proteins to virus specific soluble antigens from infected cells.

J.exp.Med. 118, 295-306.

WITTMANN, G. (1967):

Der Einfluß von 1 mol $MgCl_2$ und 2 mol NaCl auf die 50°C-Inaktivierung von Maul- und Klauenseuche(MKS)-Virus.

Zbl.Bakt., 1.Abt.Orig. 202, 133-134.

ZUR HAUSEN, H. & F. SOKOL (1969):

Fate of adenovirus type 12 genomes in nonpermissive cells.

J.Virol. 4, 256-263.

Lebenslauf

1944	21. August geboren in Berlichingen
1964	21. Februar Reifeprüfung am Albert-Schweitzer-Gymnasium Neckarsulm
1964 - 1965	Wehrdienst
1965 - 1967	Studium der Veterinärmedizin an der Justus Liebig-Universität Gießen
1967 - 1968	Studium der Veterinärmedizin an der Universität München
1968 - 1970	Studium der Veterinärmedizin an der Justus Liebig-Universität Gießen
1967	Tierärztliche Vorprüfung an der Justus Liebig-Universität Gießen
1968	Erster Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung an der Universität München
1969	Zweiter Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung an der Justus-Liebig-Universität Gießen
1970	Dritter Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung an der Justus Liebig-Universität Gießen
1970	23.12. Bestallung als Tierarzt
1971	Assistent und Vertreter in verschiedenen tierärztlichen Praxen; Wehrdienst
1972	Anfertigung der Dissertation in der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen
1972	Seit dem 1. Oktober wissenschaftlicher Mitarbeiter der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen

Ich möchte mich bei dem Präsidenten der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen, Herrn Prof. Dr. Manfred Mussgay dafür bedanken, daß er mir großzügigerweise einen Arbeitsplatz in seinem Institut zur Verfügung gestellt hat.

Mein besonders herzlicher Dank gilt Herrn Dr. Kurt Bauer für die Überlassung des Themas; Dr. Bauers jederzeit gern gewährter freundlicher Rat und seine anregende Kritik waren mir eine große Hilfe.

Das Manuskript schrieb Frau Marie-Luise Donner. Die photographischen Arbeiten wurden von Herrn Peter Schröter, die graphischen von Herrn Roland Straub ausgeführt.

